

# **Der Einfluß von Melatonin auf das Wachstum humaner Haarfollikel unter In-vitro-Bedingungen**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae ( Dr. med. )

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Anja Fischer,**  
**geboren am 10.03.1977 in Sömmerda**

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. P. Elsner, Jena
2. Prof. Dr. A. Hoffmann, Jena
3. Prof. Dr. U. Blume-Peytavi, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3. Dezember 2002

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Das Haar	1
1.2. Melatonin und Melatoninantagonist	4
1.3. Untersuchungen zum Fellwachstum unter Melatonin im Tierexperiment	
1.3.1. In-vivo-Untersuchungen	5
1.3.2. In-vitro-Untersuchungen	6
1.4. Vorstellung des Haarorgankulturmodells	7
<b>2. Zielsetzung</b>	9
<b>3. Methodik</b>	
<b>3.1. Präparation der Haarfollikel</b>	
3.1.1. Materialien	10
3.1.2. Durchführung	10
<b>3.2. Kultivierung der Follikel</b>	
3.2.1. Materialien	12
3.2.2. Herstellung der Testmedien	12
3.2.3. Durchführung	13
3.3. Längenmessung der Haarfollikel	14
3.4. Immunhistochemische Untersuchung zum Proliferationsnachweis im Haarfollikel	
3.4.1. Vorbetrachtung zum Proliferationsmarker Ki-67	16
3.4.2. Materialien	17
3.4.3. Durchführung	18
3.5. Statistik	19

## **4. Ergebnisse**

4.1.	In-vitro-Untersuchung an humanen Haarfollikeln	21
4.1.1.	Wachstum im Haarorgankulturmodell in der Basissubstanz Williams E Medium	21
4.1.2.	Wachstumsvergleich zwischen Haarfollikeln nach Kultivierung in Williams E Medium, in Melatonin und Melatoninantagonist 4-PDOT	26
4.2.	Nachweis von Ki-67 an Follikeln aus verschiedenen Testmedien	34

## **5. Diskussion**

5.1.	Diskussion der Versuchsergebnisse	
5.1.1.	Wachstum im Haarorgankulturmodell	36
5.1.2.	Haarfollikelwachstum in verschiedenen Melatonin- medien	37
5.1.3.	Nachweis der Proliferationsfraktion in Haarfollikeln nach Kultivierung in verschiedenen Medien	39
5.2.	Diskussion der Methodik	
5.2.1.	Anwendung des Haarorgankulturmodells	40
5.2.2.	Anwendung des Nachweises von Ki-67 am Haarfollikel	42

## **6. Zusammenfassung**

43

## **7. Literaturverzeichnis**

45

## **8. Anhang**

8.1.	Abkürzungen	55
8.2.	Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Diagramme	55
8.3.	Datentabellen	57

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Haar

Das Haar als Hauptbestandteil des Fells vieler Säugetiere ist lebenswichtig zur Wärmeisolation, dient aber gleichermaßen der Kommunikation, da durch Aufrichten oder Glätten des Fells Emotionen zum Ausdruck gebracht werden können. Auch beim Menschen sind Haare über den ganzen Körper verteilt, haben aber ihre Aufgabe im Wärmehaushalt weitgehend verloren. Vor allem das Kopfhaar, das die größte Haardichte am Körper aufweist, spielt als Zeichen sexueller Attraktivität in der Gesellschaft eine wesentliche Rolle und hat somit eine wichtige kosmetische Bedeutung.

Die Gesamtzahl der Haarfollikel des Erwachsenen wird auf etwa 5 Millionen geschätzt, von denen die Kopfhaut etwa 1 Million enthält. [ Champion et al. 1992 ] Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit des Haares beträgt 0,35 mm/Tag. Ein täglicher Haarverlust von bis zu 100 Haaren ist physiologisch. Mit zunehmendem Alter des Menschen kommt es zum allmählichen Verlust von Haarfollikeln sowie zur Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. [ Orfanos 1979 ]

In der Literatur unterteilt man die Körperbehaarung in drei Haartypen:

- Lanugohaare stellen die Körperbehaarung des Feten dar, die sich spätestens in der Neugeborenenphase abstoßen.
- Den Großteil der Körperoberfläche bedecken zarte, schwach kolorierte Vellushaare.
- Augenbrauen, Wimpern, Bart, Schambehaarung und Kopfhaar werden aus dicken Terminalhaaren gebildet. [ Braun-Falco et al. 1994 ]

Ein Haarfollikel setzt sich aus folgenden Anteilen zusammen: dem Haarschaft, der Haarwurzel und der Haarpapille. Der Haarschaft ragt aus der Epidermis heraus und hat einen Durchmesser von 0,06-0,12 mm. [ Schell 1997 ] Er besteht aus einer Cuticula, die den aus Keratinozyten bestehenden Kortex und die innere Medulla einschließt. Die Haarwurzel reicht bis in die Subcutis hinein und verdickt sich im unteren Bereich zum Haarbulbus. Sie ist von der inneren

und der äußeren Wurzelscheide umgeben. Der Bulbus enthält undifferenzierte Matrixzellen und Melanozyten. [ Paus et al. 1999 ] Im oberen Bulbusabschnitt erfolgt die Differenzierung sämtlicher Haarschaftzellen sowie der Zellen der inneren Wurzelscheide aus Matrixzellen. In der suprabulbär gelegenen Keratinisierungszone endet diese Differenzierung. Nerven, Gefäße und fibroblastenartige Zellen ragen als Haarpapille in den Bulbus. Haarwachstum ist nur durch ungestörte Interaktion zwischen Papille und Haarmatrix möglich. [ Jahoda et al. 1990; Schell 1997]

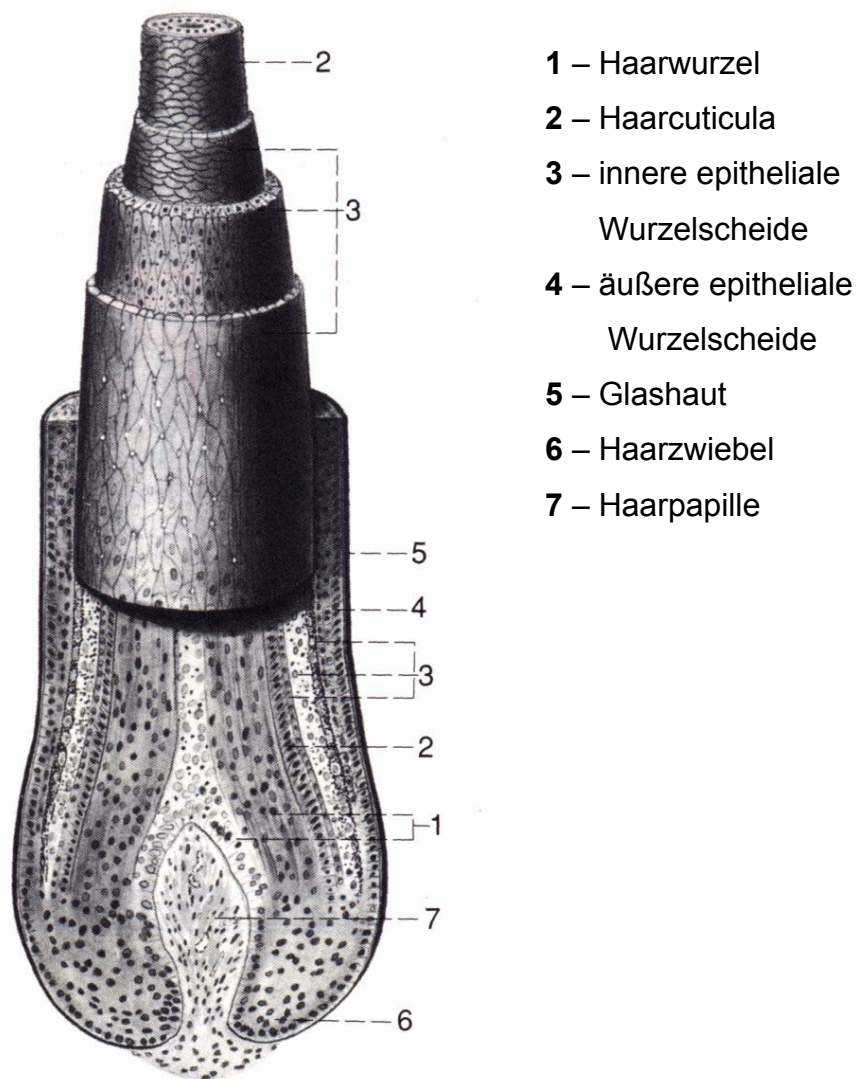


Abb.1: Aufbau des Haarfollikels [ Benninghoff 1994 ]

Das Haar unterliegt einem zyklischen Wachstum. Die Entwicklung beginnt mit einer Proliferationsphase, dem Anagen. An der Kopfhaut dauert diese Phase etwa 1000 Tage, also etwa 3 Jahre. In dieser Zeit weisen die Matrixzellen eine hohe mitotische Aktivität auf und sind besonders empfindlich für schädigende Einflüsse. Außerdem findet die Pigmentierung des Haarschaftes durch follikuläre Melanogenese statt.

Eine deutliche Abnahme der mitotischen Aktivität der Matrixzellen leitet eine Rückbildungsphase, die Katagenphase ein, die durch eine Verkleinerung des Bulbus, die nahezu vollständige Retraktion der Papille und die Bildung eines Kolbenhaares gekennzeichnet ist.

Die letzte Phase des Haarzyklus wird Telogen genannt. In dieser wird das Kolbenhaar nach etwa 3 Monaten abgestoßen. Im selben Follikel bildet sich ein neues Haar. [ Braun-Falco et al.1994; Paus 1998 ]

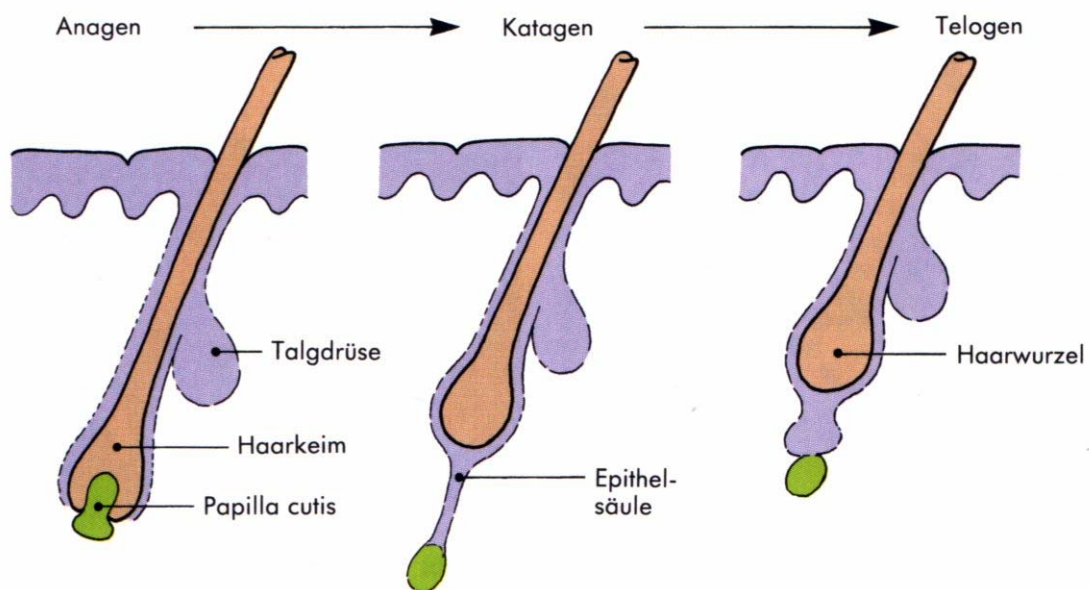


Abb. 2: Haarzyklus [ Gawkrödger 1995 ]

In der Dermatologie stellt der Haarausfall ein wichtiges Problem dar. Größere Ausdehnung und auffällige Lokalisationen eines Haarverlustes können zu Störungen des seelischen und körperlichen Wohlbefindens führen. [ Schell 1997; Paus et al. 1999 ] Der Haarausfall imponiert in unterschiedlichen Ausprägungen, es gibt diffuse und umschriebene, vernarbende und nicht

vernarbende Formen. Zahlreiche Störungen, wie zum Beispiel Fieber, strenge Diäten, emotionaler Stress, Hormonveränderungen, Entzündungen, Medikamenteneinnahme und erbliche Faktoren kommen ursächlich in Betracht. [ Champion et al. 1992 ]

Durch ihre hohe Inzidenz stellen Haarerkrankungen einen Kernpunkt wissenschaftlicher Forschung dar, da es auch heute nur wenig effektive Methoden zur Modulation der Wachstumsaktivität des menschlichen Haarfollikels gibt. [ Paus et al. 1992 ]

## 1.2. Melatonin und Melatoninantagonist

Melatonin ( N-Acethyl-5-Methoxyserotonin:  $C_{13}H_{16}N_2O_2$  ) ist ein Hormon, das hauptsächlich in der Epiphyse aus L-Tryptophan gebildet wird. Es wurde 1958 von *Lerner et al.* entdeckt und ist bis heute Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. [ Waldhauser 1983 ] Man fand eine regulative Wirkung des Melatonins auf reproduktive Rhythmen verschiedener Tiere, wobei eine starke Melatoninproduktion in der dunklen Winterperiode die Gonadenfunktion der Tiere im Frühjahr hemmte. [ Reiter 1980 ] Später erkannte man die synchronisierende Wirkung auf zirkadiane Rhythmen über neuronale Erregungen der Retina und des Nucleus suprachiasmaticus, die den Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen mit dem Hell-Dunkel-Rhythmus in Einklang bringt. [ Scott et al. 1988; Fischer et al. 1999 ]

Neue Untersuchungen lassen Eigenschaften als Radikalfänger erkennen. Damit obliegt dem Melatonin durch antioxidative Wirkung eine protektive Funktion zum Beispiel bei der Einwirkung von ultravioletter Strahlung oder Zellgiften. [ Tan et al. 1993; Reiter 1998; Reiter et al. 1998; Reiter et al. 1998 ]

Beim Menschen zeigt sich außerdem eine schlafanstoßende und leichte analgetische Wirkung. [ Waldhauser et al. 1990; Jan et al. 1994; Skene et al. 1996 ] Ferner wird ihm eine Stärkung des Immunsystems und ein Schutz des Herz-Kreislauf-Systems zugesagt. [ Hardeland 1997; Fischer et al. 1999 ]

Die Biosynthese des Melatonins wird durch den Sympathikus über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, aber vermutlich auch durch andere Neurotransmitter und Neuro-



peptide kontrolliert und zeigt einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus. [ Korf et al. 1983; Scott et al. 1988 ] Bei Dunkelheit gelangen Nervenimpulse von der Retina zur Zirbeldrüse und führen zu einer verstärkten Melatoninproduktion. Folglich wurden höchste Blutspiegel zwischen 2 und 4 Uhr morgens gemessen, die niedrigsten zwischen 12 und 14 Uhr. Der Melatoninspiegel im Blut beträgt bei beiden Geschlechtern am Tag etwa 10 pg/ml, der nächtliche Peak 250 pg/ml. Melatonin wird in der Leber abgebaut. [ Arendt 1992; Murray et al. 1996 ]

Die Melatoninsekretion unterliegt auch jahreszeitlichen Schwankungen mit Spitzenwerten im Winter und Sommer, sowie niedrigen Werten in Frühling und Herbst. [ Waldhauser 1983 ]

Mit zunehmendem Alter des Menschen sinkt der Melatoninspiegel bis auf nicht mehr nachweisbare Werte. [ Sack et al. 1986 ] Hieraus ergaben sich Vermutungen, daß Melatoningaben Alterungsprozesse verhindern bzw. verzögern, sowie die Inzidenz altersassoziierter Erkrankungen vermindern könnten. [ Reiter 1998 ]

Melatonin wird in Japan und den USA als Nahrungsergänzungsmittel gegen das Altern und bei Schlafstörungen eingenommen, in Deutschland ist es jedoch nicht zugelassen. [ Jockenhövel et al. 2001 ]

### **1.3. Untersuchungen zum Fellwachstum unter Melatonin Tierexperiment**

#### **1.3.1. In-vivo-Untersuchungen**

Weltweites Interesse gilt der Rolle von Melatonin im Tierreich, speziell der Steigerung des Schafwoll- und Kaschmirwollwuchses in der Tierproduktion. [ Paterson et al. 1994 ] Melatonin imponiert als wichtiger Mediator bei der Regelung des saisonalen Wechsels des Haarkleides vieler Säugetiere. Die Auswirkungen der Tageslänge auf das Fellwachstum werden über die Epiphyse durch Veränderung der Melatoninsekretion gesteuert. [ Rougeot et al. 1984 ]

In zahlreichen Studien wurden der Einfluß der Tageslänge bzw. direkt von Melatonin auf das Fellwachstum untersucht. Bei Schafen bewirkte ein künstlicher Anstieg der Tageslänge ein vermindertes Fellwachstum. [ Pearson et al. 1996 ] Lemminge zeigten einen Zuwachs der Felllänge nach Verkürzung der täglichen Photoperiode bzw. nach Melatonininfusionen. [ Gower et al. 1994 ] Auch bei Frettchen und Nerzen führten Melatoninbehandlungen zu einer vorzeitigen Stimulation des Fellwachstums vor dem normalen Beginn des Winterfellwachstums. Nach Abfall des Melatoninspiegels wurde ein Abwurf des Felles beobachtet. [ Pearson et al. 1989; Nixon et al. 1995; Rose et al. 1987; Rose et al. 1984 ]

In verschiedenen Untersuchungen an Kaschmirziegen verursachten Melatongaben einen Anstieg der Kaschmirproduktion. [ Nixon et al. 1993; Welch et al. 1990; Gebbie et al. 1992 ] Andere Studien dagegen beobachteten nach Neutralisierung des Melatonins durch einen Antikörper eine Zunahme des Fellwachstums. [ Paterson et al. 1994; Foldes et al. 1992 ]

Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf das Fellwachstum von Schafen wurden mit Hilfe der Pinealektomie durchgeführt. *Allain et al.* beobachteten einen starken Anstieg des Prolaktinspiegels und eine Veränderung der Aktivitätsmuster der Haarfollikel. [ Allain et al. 1986 ] In weiterführenden Studien war nach Abnahme des Melatoninspiegels ein Fellwachstumsanstieg erkennbar. [ Foldes et al. 1991 ] Diese Ergebnisse konnten von *McCloghry et al.* [ 1992 ] nicht bestätigt werden, denn es waren in der Auswertung keine signifikanten Unterschiede im Fellwachstum gegenüber nicht behandelten Schafen nachweisbar.

Es zeigt sich also, daß Melatonin bei verschiedenen Tierarten, aber auch in verschiedenen Studien an gleichen Tierarten zu sehr unterschiedlichen Veränderungen im Fellwachstum führt.

### **1.3.2. In-vitro-Untersuchungen**

In In-vitro-Studien wurde ebenfalls der Einfluß von Melatonin auf Tierhaare untersucht. Haarfollikel von Kaschmirziegen, die nach dem Haarorgankultur-

modell mit supplementiertem Williams E Medium [ Philpott et al. 1989 ] bei 37 °C kultiviert wurden, zeigten nach 4 Tagen unter Melatonin ein stärkeres Wachstum als ohne Melatonin. Das stärkste Wachstum wurde bei einer Melatoninkonzentration von 300 ng/l ( 1,29 nmol ) festgestellt. In der Studie wurde Melatonin in den Konzentrationen 50, 150, 300 und 600 ng/l ( 0,29; 0,58; 1,29; 2,58 nmol ) getestet. [ Ibraheem et al. 1994 ]

Dagegen konnten Untersuchungen an Schaffellfollikeln, die in Melatonin 1,2 nmol bzw. nur in Williams E Medium ( allerdings ohne Zusatz von Fungizone und Penizillin/ Streptomycin [ Hynd et al. 1992 ] ) kultiviert wurden, keinen Einfluß von Melatonin auf das Haarfollikelwachstum in vitro beobachten. [ Winder et al. 1995 ]

In weiterführenden Studien wurde versucht, Melatoninrezeptoren an Haarfollikeln nachzuweisen. An Ziegenfellfollikeln konnten dabei keine selektiven Rezeptoren nachgewiesen werden [ Dicks et al. 1996 ], aber an Mäusefellfollikeln wurden in der Autoradiographie selektive Melatoninrezeptoren lokalisiert. [ Slominski et al. 1994 ]

#### **1.4. Vorstellung des Haarorgankulturmodells**

Nach zahlreichen Untersuchungen tierischer Haarfollikel in vivo wurden verschiedene Modelle zur Kultivierung und Untersuchung menschlicher Haarfollikel entwickelt. In verschiedenen Kulturbedingungen wurden unterschiedliche Wachstumsergebnisse der Haarfollikel erzielt. [ Philpott et al. 1989, Kondo et al. 1990, Li et al. 1992, Imai et al. 1992, Imai et al. 1993 ]

In unserer Studie wurde das In-vitro-Modell nach *Philpott et al.* [ 1996 ] verwendet. Aus Kopfhautpräparaten präpariert man die Haarfollikel unter Erhaltung der Wurzelscheiden heraus und kultiviert sie einzeln freischwimmend in 500 µl angereichertem Williams E Medium in 24-Well-Mikrotiterplatten.

Dazu werden der Basissubstanz Williams E Medium L-Glutamin, Insulin, Hydrocortison, Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Glutamin ist ein wichtiger Ausgangsstoff im Haarstoffwechsel, der das Haarwachstum stimuliert. [ Philpott et al. 1996 ] Insulin ist für das Wachstum in vitro unbedingt erforderlich, da die

Follikel ohne Insulin rasch ins Katagenstadium übertreten. In Kombination mit Hydrocortison zeigte sich eine bessere Konstitution der Follikel als mit Insulin allein. [ Westgate et al. 1993 ]

Die Mikrotiterplatten werden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>/ 95% Luft aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen kann ein Follikelwachstum von 0,3 mm/Tag über 4 Tage beobachtet werden. Durch die Produktion eines keratinisierten Haarschaftes im Haarfollikel nimmt die Follikellänge zu und kann mit Hilfe eines Lichtmikroskopes bestimmt werden. [ Philpott et al. 1994; Philpott et al. 1996]

## 2. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, das Wachstum menschlicher Kopfhhaarfollikel nach der Methodik des Haarorgankulturmodells unter Melatoninzugabe zu beobachten. Nachdem der Einfluß von Melatonin auf das Fellwachstum verschiedener Tiere Mittelpunkt zahlreicher Studien war, sollte die vorliegende Arbeit erstmals in vitro den Einfluß von Melatonin auf das Wachstum menschlicher Haarfollikel untersuchen. Zielparameter war die Längenänderung der isolierten Haarfollikel im Verlauf der Untersuchung.

In Tierstudien wurde bereits untersucht, ob Melatoninrezeptoren an Haarfollikeln nachzuweisen sind oder der Einfluß von Melatonin auf das Fellwachstum durch Veränderung der Sekretion anderer Wachstumsfaktoren bewirkt wird. Für das menschliche Haar gibt es zur Zeit keine derartigen Untersuchungen.

Folgende Problemstellungen sollten in dieser Arbeit geklärt werden:

1. Ist das Wachstum menschlicher Haarfollikel nach dem Haarorgankulturmodell in unseren Versuchen reproduzierbar?
2. Wie unterscheiden sich verschiedene Melatoninkonzentrationen im Wachstumsverhalten der Follikel im Vergleich zur Basissubstanz Williams E Medium?
3. Ist die Wirkung von Melatonin durch den Melatoninantagonisten 4-PDOT als Hinweis auf eine Rezeptorvermittlung hemmbar?
4. Ist unterschiedliches Wachstumsverhalten der Follikel unter den verschiedenen Testmedienbedingungen durch die Darstellung der Proliferationszellfraktion mit Hilfe des Markers Ki-67, einem Antigen, das nur in proliferierenden Zellen nachweisbar ist, sichtbar?

### **3. Methodik**

#### **3.1. Präparation der Haarfollikel**

##### **3.1.1. Materialien**

Die Haarfollikel wurden menschlicher Kopfhaut entnommen. Diese wurde bis zur Bearbeitung in Gefäßen mit 0,9 %-iger isotonischer Kochsalzlösung [ Fresenius; Bad Homburg, Deutschland ] aufbewahrt. Unmittelbar vor und während der Präparation befanden sich die Kopfhautstücke in einer Plastikpetrischale in einem Gemisch aus 1/3 Earl's balanced salt solution ( EBS ) [ Kat.-Nr. E2888; Sigma; Deisenhofen, Deutschland ] und 2/3 Dulbecco's phosphate buffered saline ( PBS ) with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  [ Kat.Nr. D5780; Sigma; Deisenhofen, Deutschland ]. Zur Präparation dienten sterile Einmalskalpelle, eine anatomische Pinzette und zwei Uhrmacherpinzetten Precista ( Schweiz ) aus Stahl ( schmaler Arm, gerade, präzise Punkte 11 cm ).

##### **3.1.2. Durchführung**

Haarfollikeltragende Kopfhautbiopate, die von Patienten chirurgischer Disziplinen ( plastische Chirurgie, Unfallchirurgie, Neurochirurgie ) nach schriftlicher Einwilligung entnommen wurden, waren Ausgangsmaterial der Untersuchungen. Die Studie wurde nach positivem Votum durch die Ethikkommission Jena zugelassen.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit menschlicher Kopfhautproben wurden keine Beschränkungen hinsichtlich Geschlecht, Alter und Vorerkrankungen der Personen vorgenommen.

Bis zum Untersuchungsbeginn lagerte die Kopfhaut in Plastikgefäßen unter Zusatz physiologischer NaCl-Lösung bei 4 °C. Die Aufbewahrungszeit vor Präparationsbeginn umfaßte eine Spanne von einer Stunde bis zu zwei Tagen.

Während der Präparation wurde das Kopfhautbioptat in einer Plastikpetrischale in einer Lösung aus  $\frac{1}{3}$  EBS und  $\frac{2}{3}$  PBS aufbewahrt. Unter Aussparung deutlich geschädigter Gewebeanteile erfolgte die Portionierung des Gewebestückes in etwa 10 x 3 mm große Streifen unter einem Dissektionsmikroskop ( Abb. 3 ).

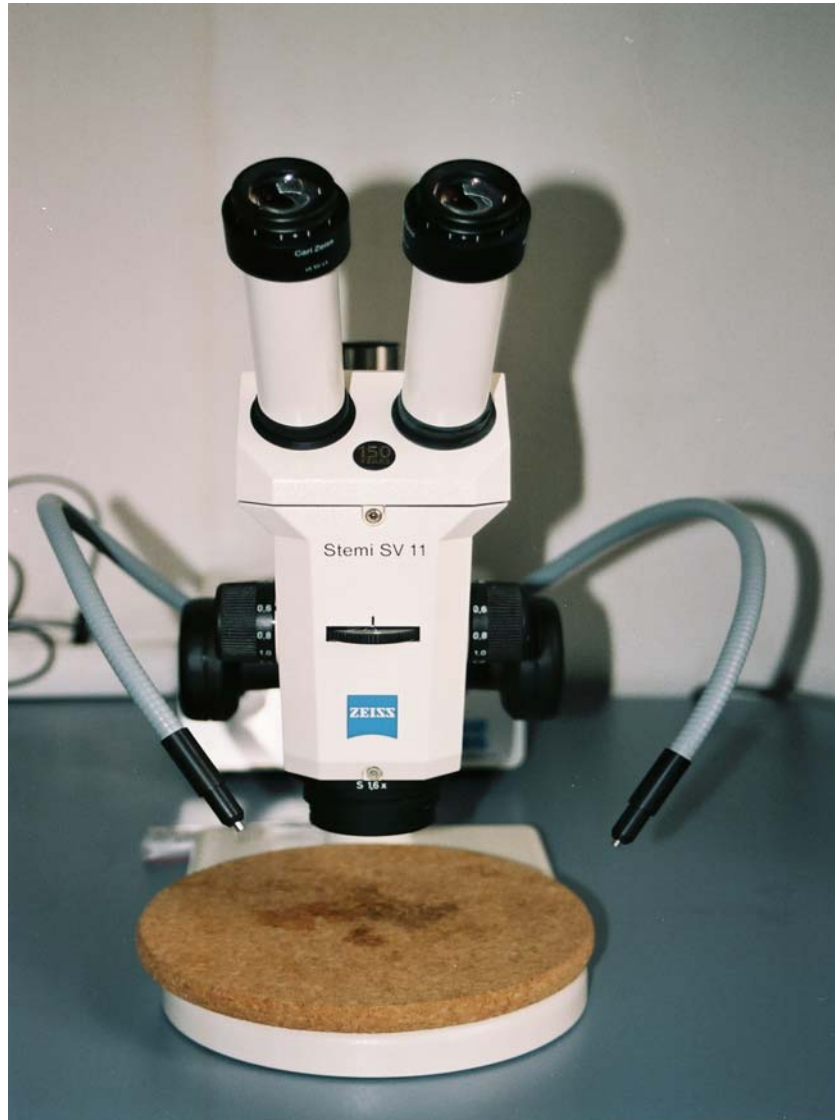


Abb.3: Dissektionsmikroskop Zeiss Stemi SV 11

Um die in der Subcutis befindlichen Anagenfollikel freizulegen, war die Trennung des Gewebes zwischen Dermis und Subcutis erforderlich. Im Anschluß wurden die Anagenfollikel unter Erhaltung der zugehörigen Wurzelscheide extrahiert und ebenfalls im EBS/PBS-Gemisch aufbewahrt.

## **3.2. Kultivierung**

### **3.2.1. Materialien**

Zur Kultivierung der Haarfollikel wurden 500 ml Williams E Medium without Glutamine [ Kat.-Nr. C-90125; Promo Cell; Heidelberg, Deutschland ] unter Zusatz von 5 ml L-Glutamin 200 mM [ Kat.-Nr. C-38100; Promo Cell; Heidelberg, Deutschland ], 500 µl Insulin-5 [ Kat.-Nr. C-31020; Promo Cell; Heidelberg, Deutschland ], 140 µl Hydrocortison [ Kat.-Nr. C 31062; Promo Cell; Heidelberg, Deutschland ] und 5 ml Penicillin/Streptomycin (1:100) [ Kat.-Nr. C 90124; Promo Cell; Heidelberg, Deutschland ] verwendet.

Melatonin [ Kat.-Nr. 444300; Calbiochem + Novabiochem; Bad Soden, Deutschland] wurde in 99,6 %igem Ethanol [ Art.-Nr. 5054.1; Carl Roth GmbH + Co.; Karlsruhe, Deutschland ] und Dulbecco`s PBS gelöst. Es wurden eine 10 mmolare Lösung, sowie eine 1 mmolare Lösung für die Herstellung der Testmedien vorbereitet. Die Melatoninlösungen wurden bei –18°C gelagert.

Als Melatoninantagonist wurde 4-Phenyl-2-propionamidotetralin ( 4-PDOT ) [ Kat.-Nr. 1034; Tocris/ Langford; Biotrend; Köln, Deutschland ] verwendet. Die Lösung erfolgte in Dimethylsulfoxid ( DMSO ) [ Art.-Nr. 802912; Merck-Schuchardt; Hohenbrunn, Deutschland ] unter Herstellung einer 1 mmolaren 4-PDOT-Lösung. Zum Wechsel der Testmedien wurden sterile Glassaugpipetten und Eppendorfpipetten verwendet.

### **3.2.2. Herstellung der Testmedien**

Zur Untersuchung des Einflusses von Melatonin auf das Haarfollikelwachstum kamen Melatoninlösungen der Konzentrationen 5 mmol, 3 mmol, 2 mmol, 1 mmol, 40 µmol, 30 µmol und 20 µmol zur Anwendung. Die vorbereitete 10-mmolare Melatoninlösung wurde im entsprechenden Verhältnis mit Williams E Medium zu Testmedien im mmol-Bereich verdünnt. Ebenso erfolgte die



Herstellung der Testmedien im  $\mu\text{mol}$ -Bereich aus der vorbereiteten 1-mmolaren Melatoninlösung.

Zur Untersuchung einer möglichen rezeptorabhängigen Melatoninwirkung wurde der Melatoninantagonist 4-PDOT eingesetzt. Dazu wurde aus der vorbereiteten 1-mmolaren 4-PDOT-Lösung eine 30  $\mu\text{molare}$  Lösung mit Williams E Medium hergestellt. Diese wurde mit einer 30  $\mu\text{molaren}$  Melatoninlösung versetzt und als Testmedium eingesetzt.

### 3.2.3. Durchführung

Nach vollständiger Extraktion aller Anagenfollikel und Verwerfung sichtbar beschädigter Follikel wurden die Follikel in 24-Well-Mikrotiterplatten verteilt. ( Abb. 4 ) Jedes Well wurde mit einem Haarfollikel und 500  $\mu\text{l}$  eines Testmediums bestückt. Als Testmedien wurden Williams E Medium, Lösungen verschiedener Melatoninkonzentrationen sowie ein Medium aus Melatonin und 4-PDOT eingesetzt.



Abb. 4: Mikrotiterplatte

Williams E Medium ist ein supplementiertes Kulturmedium, das ursprünglich für die Kultivierung von Hepatozyten entwickelt wurde und erfolgreich zur Kultivierung von Haarfollikeln verwendet wurde. [ Williams et al. 1971; Philpott et al. 1989, Ibraheem et al. 1993, Philpott et al. 1994 ]

Alle Medien wurden zuvor auf 37 °C temperiert. In jedem Ansatz erhielten mindestens acht Haarfollikel die gleiche Testsubstanz, wobei in jedem Ansatz Williams E Medium als Vergleichsmedium mitgeführt wurde.

Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5%CO<sub>2</sub>/95%Luft-Atmosphäre in Dunkelheit aufbewahrt. Alle 2 Tage erfolgte ein Medienwechsel mit Zusatz von neuem, vortemperiertem Medium, nachdem das verbrauchte Medium unter einer Laminarbox mit einer sterilen Glassaugpipette unter Sichtkontrolle aspiriert wurde, ohne den Follikel zu schädigen.

### 3.3. Längenmessung

Die erste Messung der Follikel erfolgte nach der zufälligen Zuteilung zu den verschiedenen Kulturmedien. Im Versuchsablauf schlossen sich tägliche Messungen an.

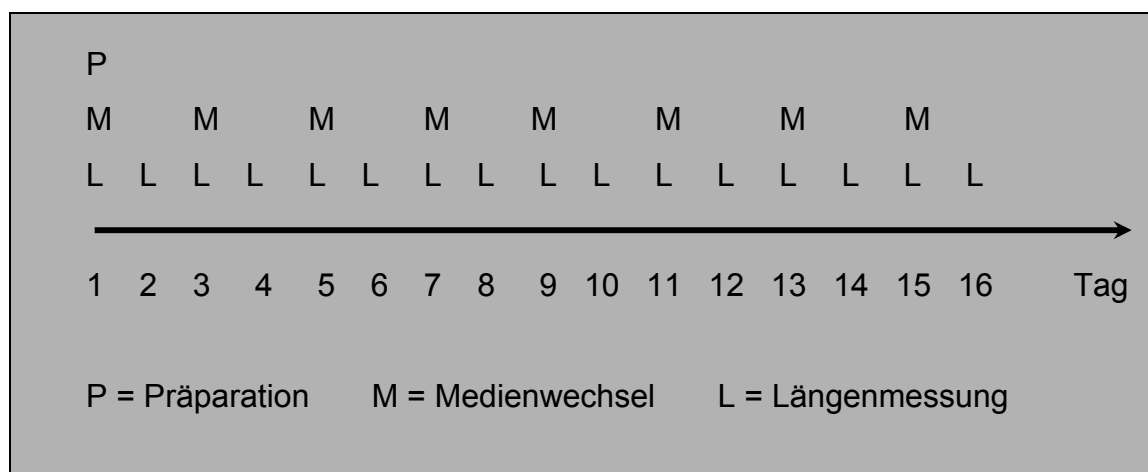


Abb. 5: Untersuchungsablauf

Die Follikellänge wurde als Bereich zwischen proximalem Haarbulbus und distalem Haarschaftende definiert. Fand innerhalb von 48 h keine Längen-

änderung mehr statt, wurden die Follikel als nicht mehr lebensfähig angesehen und aus der Kultur genommen.

Die Längen der einzelnen Follikel wurden mit Hilfe eines Auflichtmikroskopes mit skaliertem Meßokular bestimmt. ( Abb. 6 ). Die kleinstmögliche Längenänderung, die gemessen werden konnte, betrug 0,02 mm.

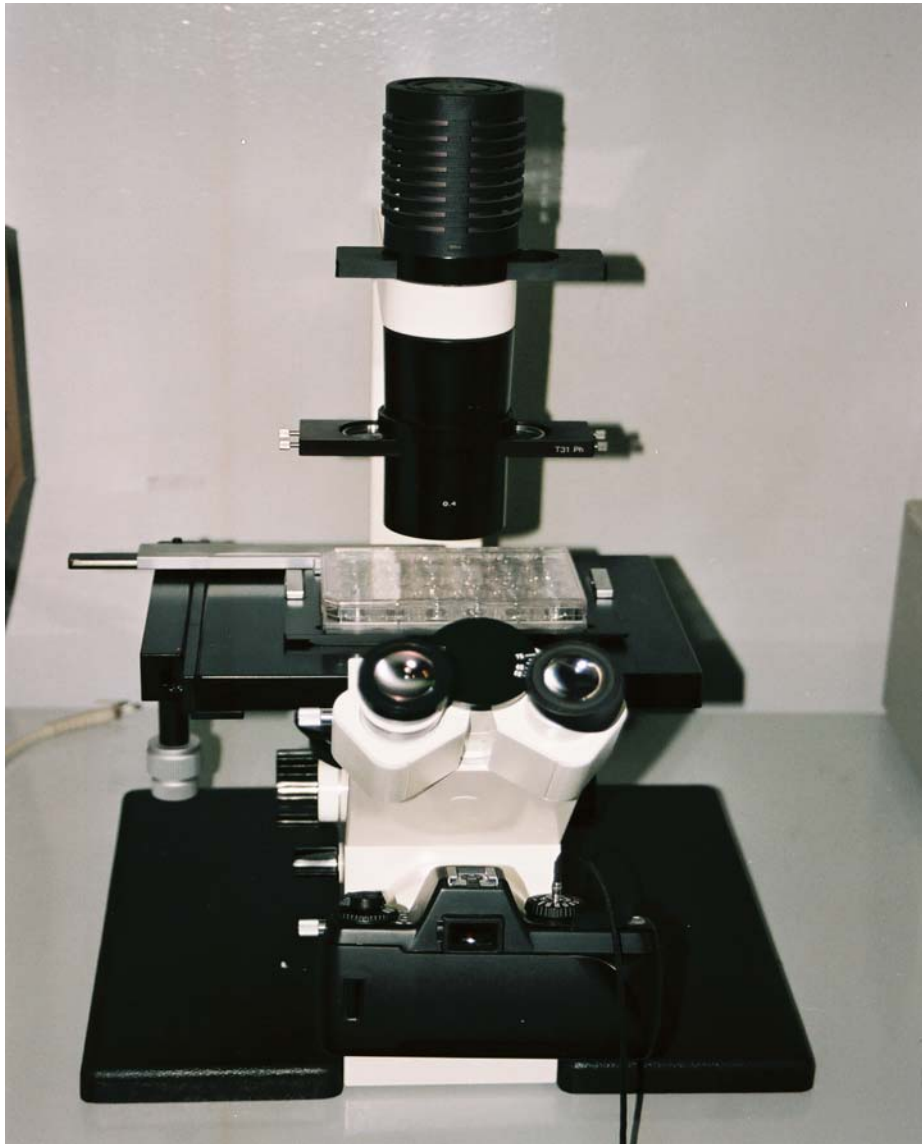


Abb. 6: Zeiss-Telaval-Auflichtmikroskop mit skaliertem Meßokular; 2,5x Objektiv

### 3.4. Immunhistochemische Untersuchung zum Proliferationsnachweis im Haarfollikel

#### 3.4.1. Vorbetrachtung zum Proliferationsmarker Ki-67

Das Haarwachstum ist wesentlich von der Anzahl proliferierender Zellen im Haarfollikel abhängig. Durch die Entwicklung eines monoklonalen Mausantikörpers gegen nukleäre Antigene können humane proliferierende Zellen nachgewiesen werden. [ Gerdes et al. 1983 ]

Die Bindung des Antikörpers Ki-67 zeigt an, daß sich eine Zelle in der Proliferationsphase befindet, d.h., daß sie das  $G_1$ -, S-,  $G_2$ - oder M-Stadium erreicht hat. Eine fehlende Antikörperbindung lässt auf eine Zelle im  $G_0$ -Stadium schliessen. Somit wird eine einfache und schnelle Beurteilung der Wachstumsfraktion möglich. [ van Erp et al. 1987; Gerdes et al. 1984 ]

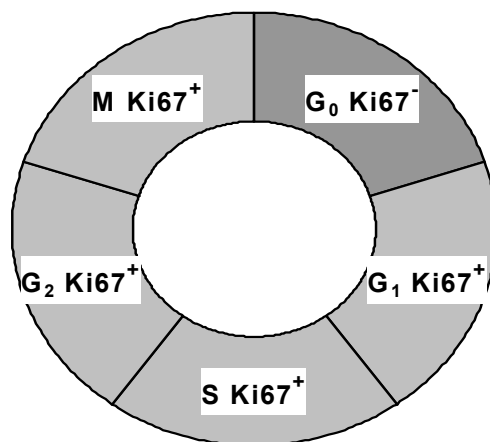


Abb. 7: Nachweis von Ki-67 im Zellzyklus

Diese Methodik wurde zum Beispiel schon in Untersuchungen des malignen Melanoms oder der Psoriasis angewendet, in denen die Anzahl Ki-67-positiver Zellen als Zeichen erhöhter Proliferationsaktivität im Vergleich zu gesunder Haut erhöht war. [ Ando et al. 1989; Soyer et al. 1989 ]

Auch in Studien an humanen Haarfollikeln kam die Darstellung dieses Proliferationsmarkers zur Anwendung. Die Bindung von Ki-67 wurde an

Anagenhaarfollikeln in Haarmatrixzellen und Zellen der äußeren Wurzelscheide beobachtet, was zeigt, daß die schnelle Zellproliferation eine wichtige Aufgabe der äußeren Wurzelscheide des Anagenfollikels ist. [ Miyauchi et al. 1990 ] Dies entspricht Studien, in denen DNA-synthetisierende Zellen durch [3H]-Thymidin oder Bromodeoxyuridin in der Autoradiographie dargestellt wurden. [ van Scott et al. 1963; Egawa et al. 1988 ] Außerdem zeigten sich zwei verschiedene Muster zytoplasmatischer Anfärbung in der äußeren Wurzelscheide. Da diese Ergebnisse jedoch nicht mit anderen Untersuchungen übereinstimmen, geht man davon aus, daß eine zytoplasmatische Anfärbung nicht in Zusammenhang mit mitotischer Aktivität steht. [ Miyauchi et al. 1990 ]

### **3.4.2. Materialien**

Die Haarfollikel wurden im gegenwärtigen Wachstumsstadium mit Merckofix – Fixierspray [ Kat.-Nr. 3981; Merck; Darmstadt ] fixiert.

Zur Silanisierung gereinigter Objektträger diente eine 2%ige Lösung von 3-(Trieth-oxysilyl)-propylamin [ Kat.-Nr. 821619; Merck; Darmstadt ] in Aceton  $\geq 99,5\%$  [ Kat.-Nr. 9372.1; Carl Roth GmbH+Co; Karlsruhe ]

Die immunhistochemische Lokalisierung und Visualisierung von Ki-67-Antigen wurde mit dem TissuGnost® Uni-Pak ABC [ Kat.-Nr. 1.20062.0001 ; Merck; Darmstadt ] durchgeführt. Es enthält Proteinblockierreagenz, biotinylierte Sekundärantikörperreagenz, Waschpufferkonzentrat, Streptavidinkonzentrat und biotinyliertes Peroxidasekonzentrat.

Als Antikörper diente monoklonaler Maus-Anti-Human-Ki-67-Antigen-Antikörper [ Kat.-Nr. V 1005; Biomeda/ Forster City; NatuTec; Frankfurt, Deutschland ]. Die Lösung erfolgte in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$ -Puffer [ Kat.-Nr. 2F1100-000; Euroimmun; Groß Grönau bei Lübeck ]. Außerdem wurden eine 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Reagenz ( AEC ) [ Kat.-Nr. 1.20017; Merck, Darmstadt ] zum Ansatz der Chromogenlösung, Hämatoxylin ( Gill-III ) 4g/l Certistain®-Hämatoxylin [ Kat.-Nr. 1.05174; Merck, Darmstadt ] zur Färbung und Aquatex® [ Kat.-Nr. 1.08562; Merck, Darmstadt ] zur Einbettung verwendet.

### 3.4.3. Durchführung

Die immunhistochemische Lokalisierung und Visualisierung von zellulärem Antigen Ki-67 erfolgt in einer 3-Stufen-Sandwich-Technik: Das Präparat wird im ersten Schritt mit unmarkiertem Primärantikörper inkubiert. An diesen Antikörper bindet ein mit Biotin markierter polyvalenter Sekundärantikörper. Nachfolgend wird das Markermolekül aus einem präformierten Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase an den Biotinanteil des Sekundärantikörpers gebunden.

Nach täglicher Längenmessung der Haarfollikel erfolgte am 4. Untersuchungstag die Fixierung intakter, noch wachsender Follikel mit Fixierspray Zytofix im gegenwärtigen Wachstumsstadium. Die Haarfollikel wurden im Anschluß über 24 Stunden luftgetrocknet.

Die weitere Bearbeitung erforderte eine Fixierung der Follikel auf silanisierten Objektträgern. Dafür wurden gereinigte Objektträger mit einer 2%igen 3-(Triethoxysilyl)-propylaminlösung behandelt und über Nacht bei 42 °C getrocknet.

Die Haarfollikel wurden vor der Fixierung erneut 10 min in Williams E Medium getränkt, auf Filterpapier abgetupft und auf die vorbehandelten Objektträger aufgebracht. Sie wurden über 24 Stunden luftgetrocknet und bis zur Färbung bei 4 °C aufbewahrt.

Es wurden 10 Follikel nach Kultivierung unter Melatonin 30 µmol, 6 Follikel unter Melatonin + 4-PDOT 30 µmol, sowie 9 Follikel unter Williams E Medium getestet. Parallel wurden 3 Follikel jeder Konzentration als Negativkontrollen mitgeführt. Negativkontrollen sind Präparate, die anstelle des Primärantikörpers mit unspezifischem IgG in gleicher Konzentration wie der Primärantikörper inkubiert werden.

Der Färbevorgang erfolgte in einem Färbeautomaten ( Merck ). Zu Beginn wurden die Präparate in Aqua dest. und unverdünnter Proteinblockiersubstanz gewaschen und in feuchte Kammern mit Aqua dest. eingebettet.

Der Primärantikörper wurde aus 1,2 ml einer 1%igen Lösung aus AB-Serum und Puffer und 25 µl ( Mischungsverhältnis 1:50 ) monoklonalem Mausantikörper gegen Ki-67 Antigen hergestellt. Auf jeden Follikel wurde 1 Tropfen

Primärantikörperlösung bzw. für die Negativkontrolle 1%ige AB-Serumlösung aufgebracht.

Nach Inkubation bei 37°C im Brutschrank schloß sich die Inkubation in unverdünntem, mit Biotin markiertem polyklonalen Sekundärantikörper und anschließend in einem Gemisch aus Streptavidin- und biotinylierter Peroxidase-lösung an.

Danach wurde den Präparaten eine Chromogenlösung aus Acetatpufferkonzentrat, Aqua dest., AEC-Reagenz und 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt.

Die Präparate wurden mit Hämatoxylin gefärbt und in Aquatex eingebettet.

### **3.5. Statistik**

Die Längenwerte der Haarfollikel aller Untersuchungstage wurden in Tabellen ( s. Anhang ) zusammengestellt. Zur Auswertung der Messungen wurde für jeden Tag die Differenz zwischen ermittelter Länge und der Ausgangslänge am Tag 1 mit dem EXCEL-Programm ( für Windows `97 ) bestimmt. Aus diesen Daten wurden für jeden Untersuchungstag und jedes Medium ( Williams E Medium; Me 1 mmol, 2 mmol, 3 mmol, 5 mmol, 20 µmol, 30 µmol, 40 µmol; Me+P 30 µmol ) die Mittelwerte mit der Standardabweichung sowie die Mediane mit dem Interquartilbereich (  $q_{75} - q_{25}$  ) berechnet. Das Wachstumsverhalten wurde in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt. Außerdem wurde die Wachstumsdauer unter den verschiedenen Testmedien ermittelt und graphisch dargestellt.

Zum Nachweis eines signifikanten Haarfollikelwachstums wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ausgewählt [ Sachs 1992 ] und für jedes Testmedium die Mittelwerte von Tag 1 mit denen von Tag 2 bis Tag 10 verglichen. Zur korrekten Auswahl des Testverfahrens erfolgte zuvor im SPSS-Programm ( SPSS 7,5 für Windows ) die Erstellung von Boxplots zur Prüfung auf Normalverteilung. Es zeigte sich, daß die Meßdaten nicht normalverteilt waren.

Für jeden Untersuchungstag wurden im Mann-Withney-Test für unabhängige Stichproben Wachstumsunterschiede zwischen den verschiedenen Melatoninmedien und Williams E Medium auf Signifikanz geprüft. [ Sachs 1992 ] Dabei

wird untersucht, ob die Daten aus einer bestimmten Grundgesamtheit stammen oder eine Übereinstimmung auch dem Zufall zugeschrieben werden konnte.

[ Sachs 1992 ]

Die Wirksamkeit der Testverfahren liegt für große und kleine Stichproben bei 95%. Es wurde deshalb eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

[ Sachs 1992 ]



## 4. Ergebnisse

### 4.1. In-vitro-Untersuchung an humanen Haarfollikeln

Nach Entnahme der Hautbioptate umfaßte die Aufbewahrungszeit vor Präparationsbeginn eine Spanne von einer Stunde bis zu zwei Tagen. Die Präparatgröße betrug 0,5 – 1,5 cm<sup>2</sup>.

Innerhalb einer Stunde konnten etwa 50 Haarfollikel extrahiert werden. Durchschnittlich 50% der extrahierten Follikel wurden in die Studie aufgenommen, da sie keine sichtbaren Schädigungen aufwiesen und als Follikel im Anagenstadium beurteilt wurden.

Somit wurden insgesamt 385 Haarfollikel aus 17 Präparationsansätzen in die Auswertung einbezogen.

#### 4.1.1. Wachstum im Haarorgankulturmodell in der Basis-substanz Williams E Medium

Anhand von 161 Haarfollikeln wurde überprüft, ob in unserem Labor das Wachstum menschlicher Haarfollikel analog des Haarorgankulturmodelles nach *Philpott et al.* reproduzierbar war. Die große Anzahl an Haarfollikeln resultiert aus der stetigen Mitführung von Williams E Medium als Vergleichssubstanz in jedem der 17 Präparationsansätze.

Für die ermittelten Haarfollikellängen wurden zur statistischen Auswertung die Mittelwerte, die Mediane, die Standardabweichungen und die Interquartilbereiche (  $q_{75}$ - $q_{25}$  ) bestimmt. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Das relative Längenwachstum der Haarfollikel ist in Diagramm 1 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Im Untersuchungszeitraum von 10 Tagen ist ein kontinuierliches Wachstum erkennbar, das anhand des Wilcoxon-Testes bis Tag 10 mit  $p < 0,001$  als signifikant nachgewiesen wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt betrug der Längenzuwachs 0,90 mm.

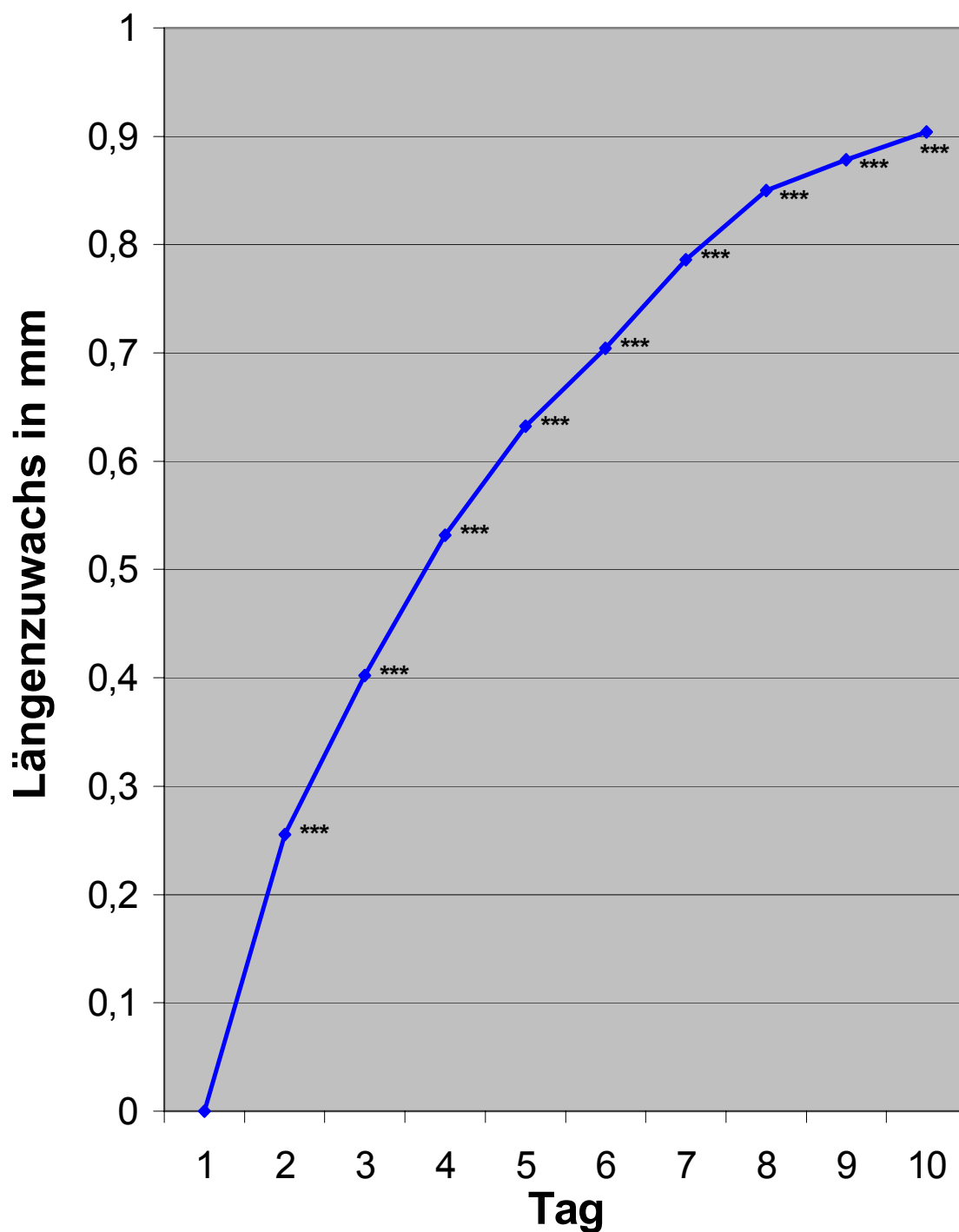
In Diagramm 2 wird der tägliche Längenzuwachs der Haarfollikel, der als Differenz der Längenmessungen zweier aufeinanderfolgender Untersuchungstage bestimmt wurde, verdeutlicht. Der stärkste Längenzuwachs mit 0,26 mm liegt bis Tag 2 vor. Im weiteren Verlauf liegt der tägliche Längenzuwachs bis Tag 5 zwischen 0,1 bis 0,14 mm. An den folgenden Untersuchungstagen ist ein gleichmäßiges Wachstum bis zum 8. Untersuchungstag nachzuweisen mit einem durchschnittlichen Längenwachstum von 0,07 mm/d. Bis Tag 10 ist dann nur noch ein geringer täglicher Längenzuwachs unter 0,05 mm sichtbar.

Im Studienverlauf zeigte sich, daß die Wachstumsdauer einer starken Schwankung innerhalb der einzelnen Präparationsansätze sowie zwischen den verschiedenen Ansätzen unterlag. Als maximale Wachstumsdauer wurden 16 Tage beobachtet, die minimale betrug 1 Tag.



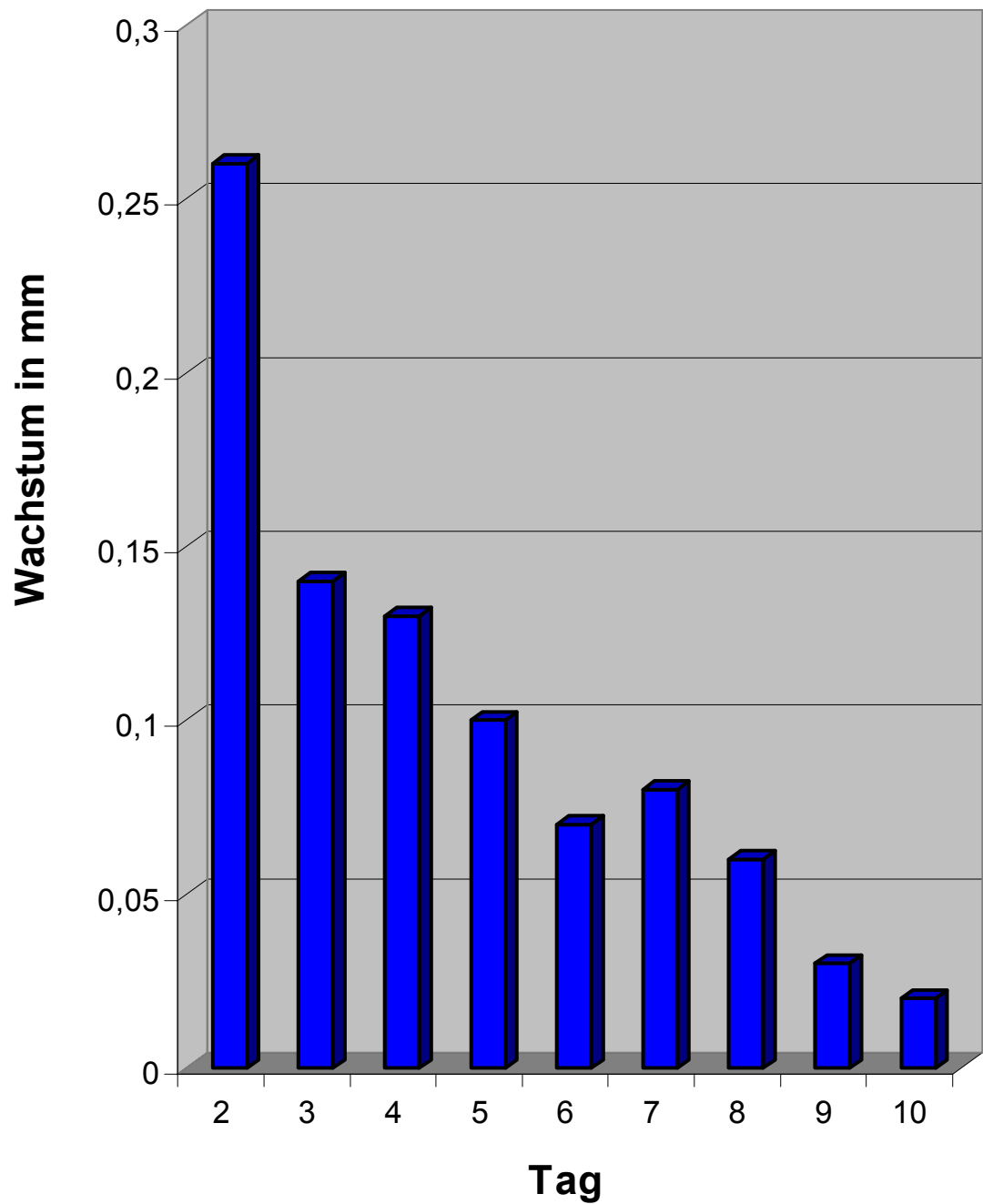
Abb. 8: a) Haarfollikel am Tag 2: 1,74 mm ; b) am Tag 5: 2,18 mm

## Relatives Wachstum unter Williams E Medium im Haarorgankulturmodell



Diagr. 1: Relatives Haarfollikelwachstum in Williams E Medium ( Signifikanz p in Abhängigkeit vom Untersuchungstag: \*\*\* -  $p < 0,001$  )

### Tägliche Längenzunahme von 161 Haarfollikeln unter Williams E Medium

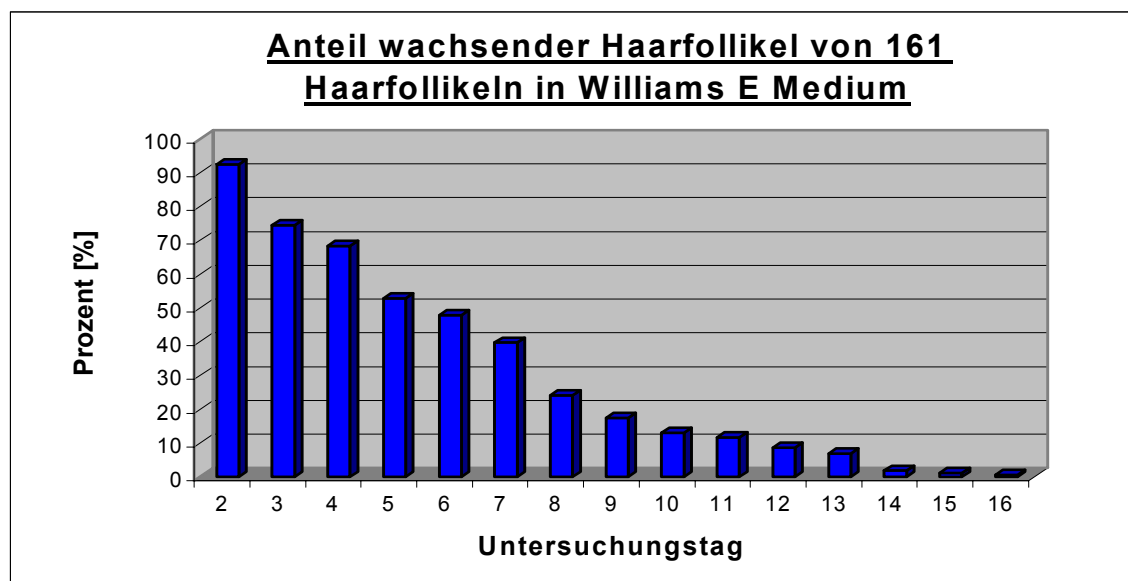


Diagr. 2: Täglicher Längenzuwachs der Haarfollikel in Williams E Medium

In Diagramm 3 ist zu erkennen, daß der Anteil wachsender Haarfollikel bezogen auf die Ausgangsfollikelzahl täglich deutlich sinkt. Am 5. Untersuchungstag nahmen nur noch 50% der Haarfollikel an Länge zu. Etwa 10% wuchsen länger als 10 Tage. Diese Ergebnisse sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tag	Mittelw. [mm]	Median [mm]	Stand.- abw.	Inter- quartilb.	Wachs- tum [mm]	wachsende Follikel Anzahl	in%
2	0,26	0,18	0,26	0,24	0,26	149	92,55
3	0,40	0,34	0,30	0,38	0,14	120	74,54
4	0,53	0,52	0,35	0,52	0,13	110	68,33
5	0,63	0,6	0,42	0,64	0,10	85	52,8
6	0,70	0,64	0,48	0,74	0,07	77	47,83
7	0,79	0,72	0,54	0,90	0,08	64	39,76
8	0,85	0,76	0,61	1,00	0,06	39	24,23
9	0,88	0,76	0,64	1,08	0,03	28	17,4
10	0,90	0,78	0,67	1,10	0,02	20	13,03

Tab.1: Meßdatenauswertung des Follikelwachstums unter Williams E Medium



Diagr. 3: Anteil wachsender Haarfollikel in Williams E Medium in Abhängigkeit vom Untersuchungstag

#### **4.1.2. Wachstumsvergleich zwischen Haarfollikeln nach Kultivierung in Williams E Medium, Melatonin und Melatoninantagonist 4-PDOT**

Weiterhin wurde das Wachstum der Haarfollikel unter Zusatz verschiedener melatoninhaltiger Medien verglichen.

Es zeigte sich, daß in allen Medien ein signifikantes Wachstum ab Tag 2 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  zu beobachten war.

Das Wachstum der Haarfollikel im  $\mu\text{mol}$ -Bereich ist in Diagramm 4 dargestellt. Die zugrundeliegenden Daten sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraums zeigte sich das stärkste Wachstum in Me 30  $\mu\text{mol}$ . In dieser Konzentration wurden 28 Follikel ausgewertet, bei denen ein Längenzuwachs bis Tag 10 von 0,99 mm festgestellt wurde. In Williams E Medium wurde ein Längenzuwachs von 0,9 mm bis Tag 10 nachgewiesen. Der im Diagramm erkennbare Wachstumsunterschied gegenüber Williams E Medium wurde jedoch im statistischen Testverfahren nur am Tag 2 als signifikant bestätigt. Die Längenzunahme betrug in der Melatoninanwendung an diesem Tag 0,38 mm, in Williams E Medium nur 0,26 mm.

Weiterhin wurden 25 Haarfollikel in Me 20  $\mu\text{mol}$  und 32 Haarfollikel in Me 40  $\mu\text{mol}$  ausgewertet. Beide Konzentrationen wiesen bis Tag 4 annähernd gleiche Wachstumskurven wie Williams E Medium auf. Danach kam es zum Rückgang der Längenzunahme im Vergleich zu Williams E Medium. Signifikante Unterschiede waren jedoch auch hier nicht nachzuweisen.

Das Wachstum der Haarfollikel im mmol-Bereich Melatonin ist in Diagramm 5 dargestellt. Die zugrundeliegenden Daten wurden in Tabelle 3 aufgeführt.

In allen mmol-Melatoninkonzentrationen stellt sich ein geringerer Längenzuwachs als in Williams E Medium dar. Zur Auswertung kamen hierbei 17 Follikel in Me 5 mmol, 22 Follikel in Me 3 mmol, 33 Haarfollikel in Me 2 mmol und 30 Follikel in Me 1 mmol.

Haarfollikel, die in Me 3 mmol und 5 mmol kultiviert wurden, ließen im gesamten Untersuchungszeitraum keinen signifikanten Wachstumsunterschied im

Vergleich zu Williams E Medium erkennen. Ähnliches Wachstumsverhalten wurde in Me 2 mmol beobachtet. Jedoch wuchsen die Haarfollikel an Tag 2 und 3 signifikant geringer als in Williams E Medium. Am zweiten Untersuchungstag wurde ein Wachstum von 0,15 mm und am Tag 3 von 0,29 mm beobachtet. Im Gegensatz dazu erreichten die Haarfollikel in Williams E Medium einen Längenzuwachs von 0,26 mm bzw. 0,4 mm.

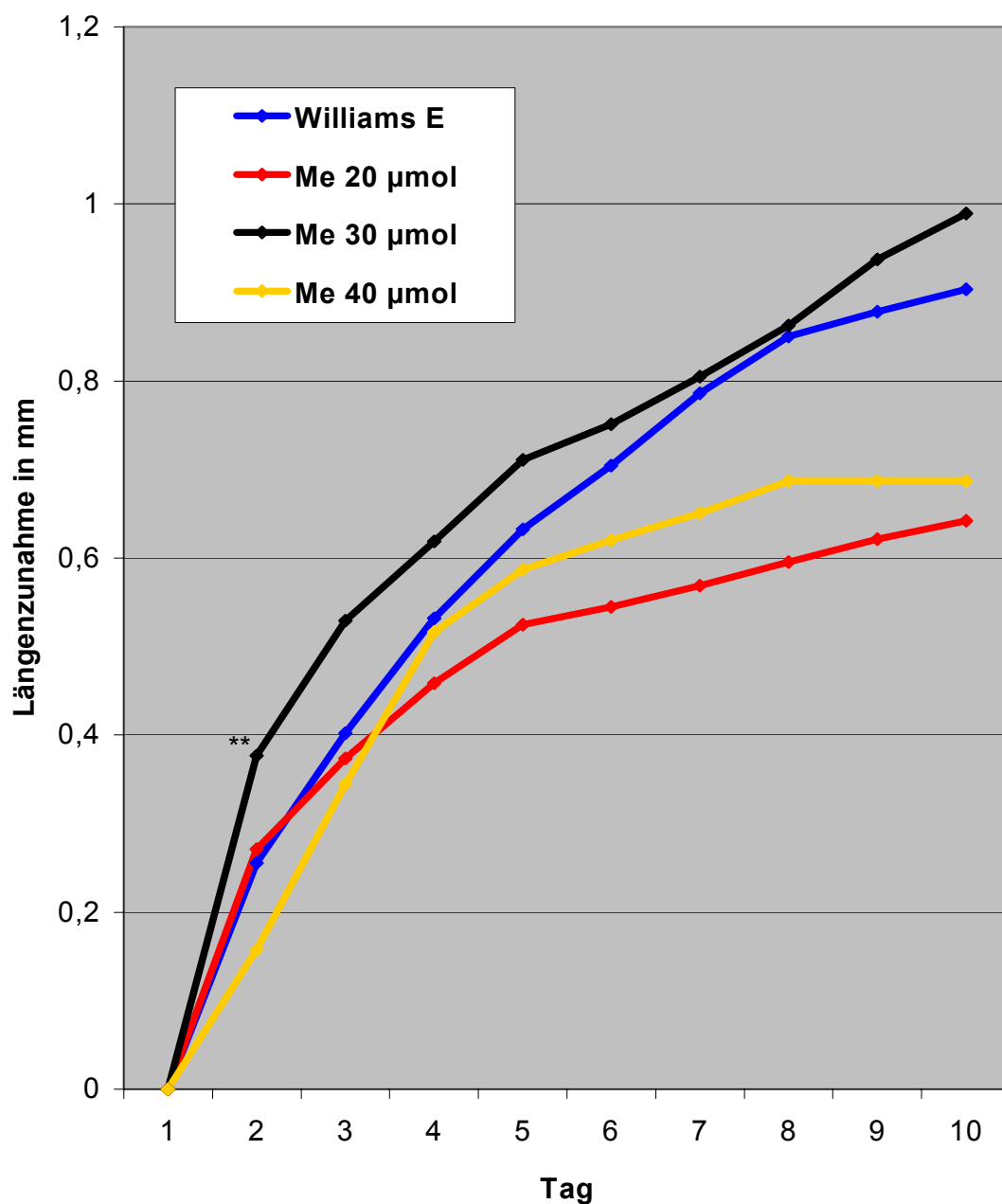
In Me 1 mmol war von Tag 3 bis Tag 10 ein signifikant geringeres Wachstum als nach Kultivierung in Williams E Medium zu verzeichnen.

Tag	Medium	Follikelzahl	Mittelwert	Stand.-abw.	Median	Interquart.
2	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,27	0,20	0,30	0,20
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,38 **	0,26	0,28	0,39
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,16	0,13	0,14	0,17
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,18	0,20	0,12	0,26
	Williams E	161	0,26	0,26	0,18	0,24
3	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,37	0,20	0,34	0,32
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,53	0,38	0,43	0,41
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,34	0,20	0,29	0,35
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,26 **	0,19	0,20	0,26
	Williams E	161	0,40	0,30	0,34	0,38
4	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,46	0,21	0,40	0,30
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,62	0,41	0,55	0,51
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,52	0,31	0,49	0,48
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,32 ***	0,21	0,24	0,26
	Williams E	161	0,53	0,35	0,52	0,52
5	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,52	0,27	0,46	0,42
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,71	0,44	0,68	0,49
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,59	0,34	0,59	0,61
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,39 ***	0,28	0,34	0,38
	Williams E	161	0,63	0,42	0,60	0,64
6	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,54	0,30	0,46	0,50
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,75	0,47	0,78	0,57
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,62	0,38	0,64	0,61
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,41 ***	0,32	0,34	0,38
	Williams E	161	0,70	0,48	0,64	0,74
7	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,57	0,34	0,46	0,52
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,81	0,52	0,83	0,64
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,65	0,42	0,64	0,63
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,43 ***	0,39	0,34	0,36
	Williams E	161	0,79	0,54	0,72	0,90
8	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,60	0,39	0,46	0,52
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,86	0,57	0,87	0,81
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,69	0,47	0,64	0,66
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,45 ***	0,46	0,34	0,36
	Williams E	161	0,85	0,61	0,76	1,00
9	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,62	0,44	0,46	0,52
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,94	0,65	0,89	0,96
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,69	0,47	0,64	0,66
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,45 ***	0,46	0,34	0,36
	Williams E	161	0,88	0,64	0,76	1,08
10	Me 20 $\mu\text{mol}$	25	0,64	0,48	0,46	0,52
	Me 30 $\mu\text{mol}$	28	0,99	0,70	0,93	1,01
	Me 40 $\mu\text{mol}$	32	0,69	0,47	0,64	0,66
	Me+P 30 $\mu\text{mol}$	37	0,45 ***	0,46	0,34	0,36
	Williams E	161	0,90	0,67	0,78	1,10

Tab. 2: Statistik für das Wachstum in Melatonin im  $\mu\text{mol}$ -Bereich ( Signifikanz p im Vergleich zu Williams E Medium: \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ )



**Relatives Haarfollikelwachstum in  
Melatoninkonzentrationen des  $\mu\text{mol}$ -Bereiches  
und Williams E Medium**

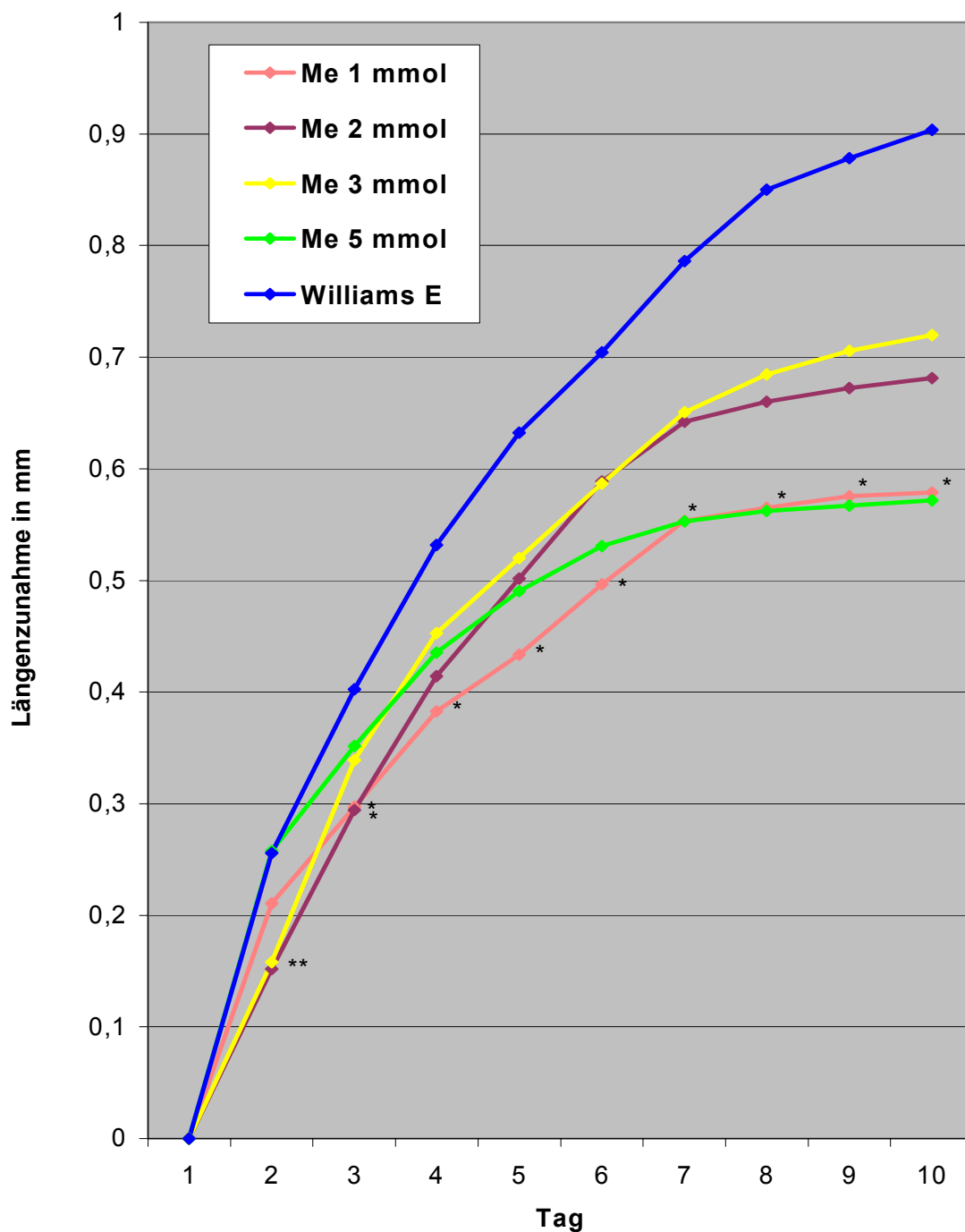


Diagr. 4: Relatives Wachstum der Haarfollikel in Melatonin im  $\mu\text{mol}$ -Bereich  
( Signifikanz p im Vergleich zu Williams E Medium: \*\* -  $p < 0,005$ )

Tag	Medium	Follikelzahl	Mittelwert	Stand.-abw.	Median	Interquart.
2	Me 1 mmol	30	0,21	0,24	0,12	0,13
	Me 2 mmol	33	0,15 **	0,17	0,11	0,12
	Me 3 mmol	22	0,16	0,12	0,14	0,15
	Me 5 mmol	17	0,26	0,26	0,12	0,40
	Williams E	161	0,26	0,26	0,18	0,24
3	Me 1 mmol	30	0,30 *	0,25	0,20	0,29
	Me 2 mmol	33	0,29 *	0,23	0,23	0,27
	Me 3 mmol	22	0,34	0,24	0,29	0,28
	Me 5 mmol	17	0,35	0,26	0,28	0,38
	Williams E	161	0,40	0,30	0,34	0,38
4	Me 1 mmol	30	0,38 *	0,28	0,32	0,38
	Me 2 mmol	33	0,41	0,28	0,37	0,51
	Me 3 mmol	22	0,45	0,30	0,42	0,49
	Me 5 mmol	17	0,44	0,31	0,38	0,38
	Williams E	161	0,53	0,35	0,52	0,52
5	Me 1 mmol	30	0,43 *	0,30	0,37	0,45
	Me 2 mmol	33	0,50	0,33	0,43	0,59
	Me 3 mmol	22	0,52	0,35	0,5	0,535
	Me 5 mmol	17	0,49	0,33	0,48	0,36
	Williams E	161	0,63	0,42	0,6	0,64
6	Me 1 mmol	30	0,50 *	0,35	0,45	0,47
	Me 2 mmol	33	0,59	0,40	0,52	0,755
	Me 3 mmol	22	0,59	0,41	0,54	0,63
	Me 5 mmol	17	0,53	0,35	0,48	0,42
	Williams E	161	0,70	0,48	0,64	0,74
7	Me 1 mmol	30	0,55 *	0,39	0,53	0,51
	Me 2 mmol	33	0,64	0,46	0,52	0,81
	Me 3 mmol	22	0,65	0,49	0,54	0,79
	Me 5 mmol	17	0,55	0,37	0,48	0,44
	Williams E	161	0,79	0,54	0,72	0,90
8	Me 1 mmol	30	0,57 *	0,41	0,53	0,48
	Me 2 mmol	33	0,66	0,49	0,52	0,83
	Me 3 mmol	22	0,68	0,56	0,54	0,79
	Me 5 mmol	17	0,56	0,38	0,48	0,44
	Williams E	161	0,85	0,61	0,76	1,00
9	Me 1 mmol	30	0,58 *	0,43	0,53	0,48
	Me 2 mmol	33	0,67	0,50	0,52	0,83
	Me 3 mmol	22	0,71	0,60	0,54	0,80
	Me 5 mmol	17	0,57	0,38	0,52	0,44
	Williams E	161	0,88	0,64	0,76	1,08
10	Me 1 mmol	30	0,58 *	0,44	0,53	0,48
	Me 2 mmol	33	0,68	0,52	0,52	0,83
	Me 3 mmol	22	0,72	0,63	0,54	0,80
	Me 5 mmol	17	0,57	0,38	0,56	0,44
	Williams E	161	0,90	0,67	0,78	1,10

Tab. 3: Statistik für das Wachstum in Melatonin im mmol-Bereich ( Signifikanz p im Vergleich zu Williams E Medium: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$  )

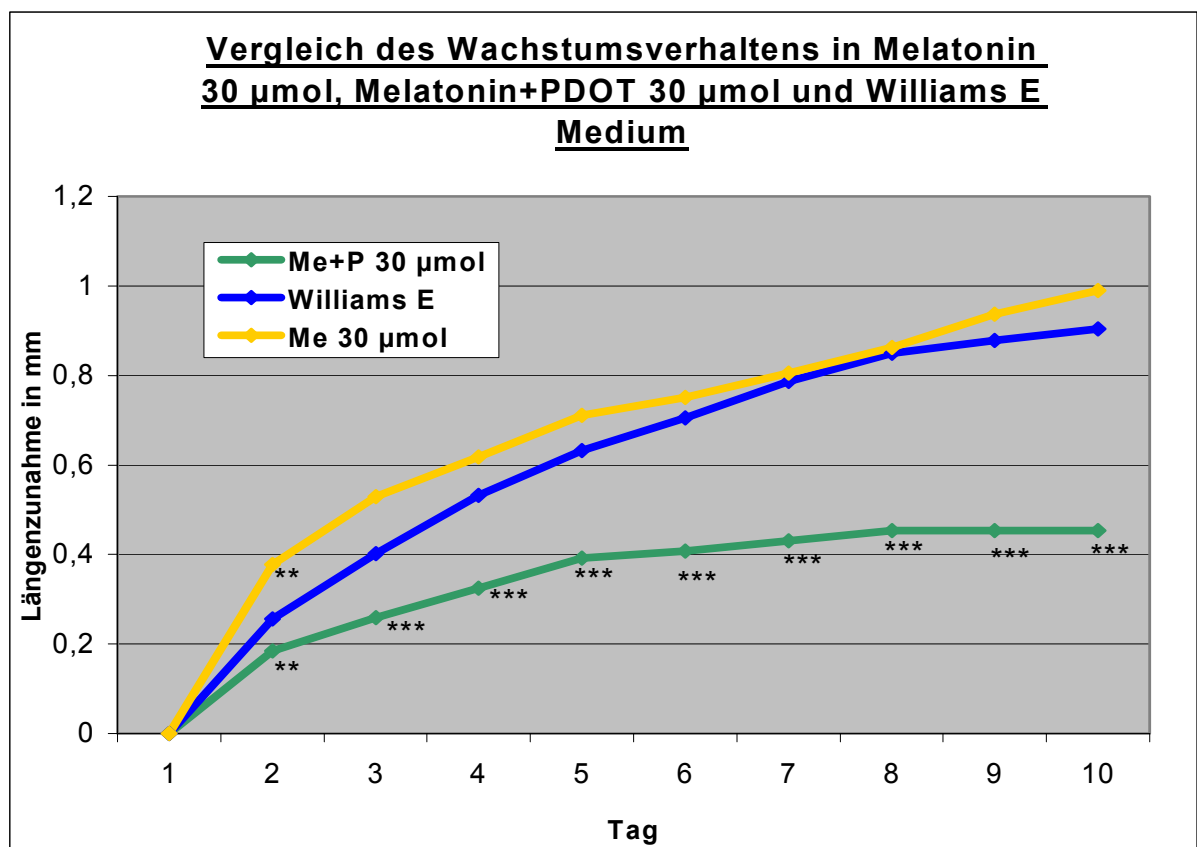
**Relatives Haarfollikelwachstum in  
Melatoninkonzentrationen des mmol-Bereiches  
und Williams E Medium**



**Diagr. 5:** Relatives Wachstum der Haarfollikel in Melatonin im mmol-Bereich  
( Signifikanz p im Vergleich zu Williams E Medium: \* -  $p < 0,05$ ;  
\*\* -  $p < 0,005$  )

37 Haarfollikel wurden dahingehend getestet, ob der Einfluß von Melatonin auf das Follikelwachstum durch den Zusatz eines Melatoninantagonisten hemmbar ist und damit die Melatoninwirkung am Haarfollikel einer Rezeptorvermittlung unterliegen könnte.

In Diagramm 6 ist das Wachstumsverhalten von Follikeln in Williams E Medium, Me 30 µmol und Me+P 30 µmol mit Darstellung der signifikanten Unterschiede zu Williams E Medium aufgezeigt. Das den Antagonisten enthaltende Medium bewirkte ein signifikant reduziertes Wachstum der Haarfollikel sowohl im Vergleich zu Me 30 µmol allein ab Tag 2 bis Tag 10 mit  $p < 0,005$ , als auch zu Williams E Medium von Tag 3 bis Tag 10 mit  $p < 0,005$ .



**Diagr. 6:** Wachstumsverhalten in Melatonin [ Me ] 30 µmol, Williams E Medium und Melatonin + 4-PDOT [ Me+P ] 30 µmol ( Signifikanz p im Vergleich zu Williams E Medium: \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  )

Wie schon im Basismedium zu beobachten war, kam es in den Melatoninmedien zum vergleichbaren Abfall der Anzahl wachsender Haarfollikel im Untersuchungsverlauf.

Die statistischen Signifikanzen für den Vergleich aller Testmedien mit Williams E Medium, die im Mann-Whitney-Test ermittelt wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

	Williams E Medium gegen								Me 30 µmol gegen
p an Tag	Me 5 mmol	Me 3 mmol	Me 2 mmol	Me 1 mmol	Me 40 µmol	Me 30 µmol	Me 20 µmol	Me+P 30 µmol	Me+P 30 µmol
2	0,652	0,113	0,005**	0,233	0,064	0,003**	0,27	0,108	0,002**
3	0,49	0,393	0,015*	0,023*	0,503	0,084	0,92	0,002**	0***
4	0,226	0,32	0,059	0,016*	0,95	0,34	0,569	0***	0,001***
5	0,16	0,252	0,086	0,011*	0,762	0,362	0,407	0,001***	0,001***
6	0,18	0,34	0,187	0,024*	0,5	0,517	0,231	0***	0***
7	0,118	0,249	0,197	0,034*	0,398	0,509	0,18	0***	0***
8	0,093	0,24	0,096	0,024*	0,244	0,711	0,1	0***	0***
9	0,088	0,244	0,205	0,024*	0,197	0,59	0,117	0***	0***
10	0,089	0,229	0,095	0,02*	0,169	0,476	0,123	0***	0***

Tab. 4: Statistische Signifikanzen aus dem Vergleich der Testmedien im Mann-Whitney-Test ( Signifikanzen p: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  )

## 4.2. Nachweis von Ki-67 an Follikeln aus verschiedenen Testmedien

Am Tag 4 wurde zum weiteren Nachweis verschiedener Wachstumstendenzen die Proliferationszellfraktion mit Hilfe des Markers Ki-67 dargestellt. Zur Kontrolle wurden je 3 Negativproben mitgeführt, in denen keine Anfärbung sichtbar war. In Abb. 9 sind je ein Haarfollikel aus den untersuchten Testmedien wiedergegeben.

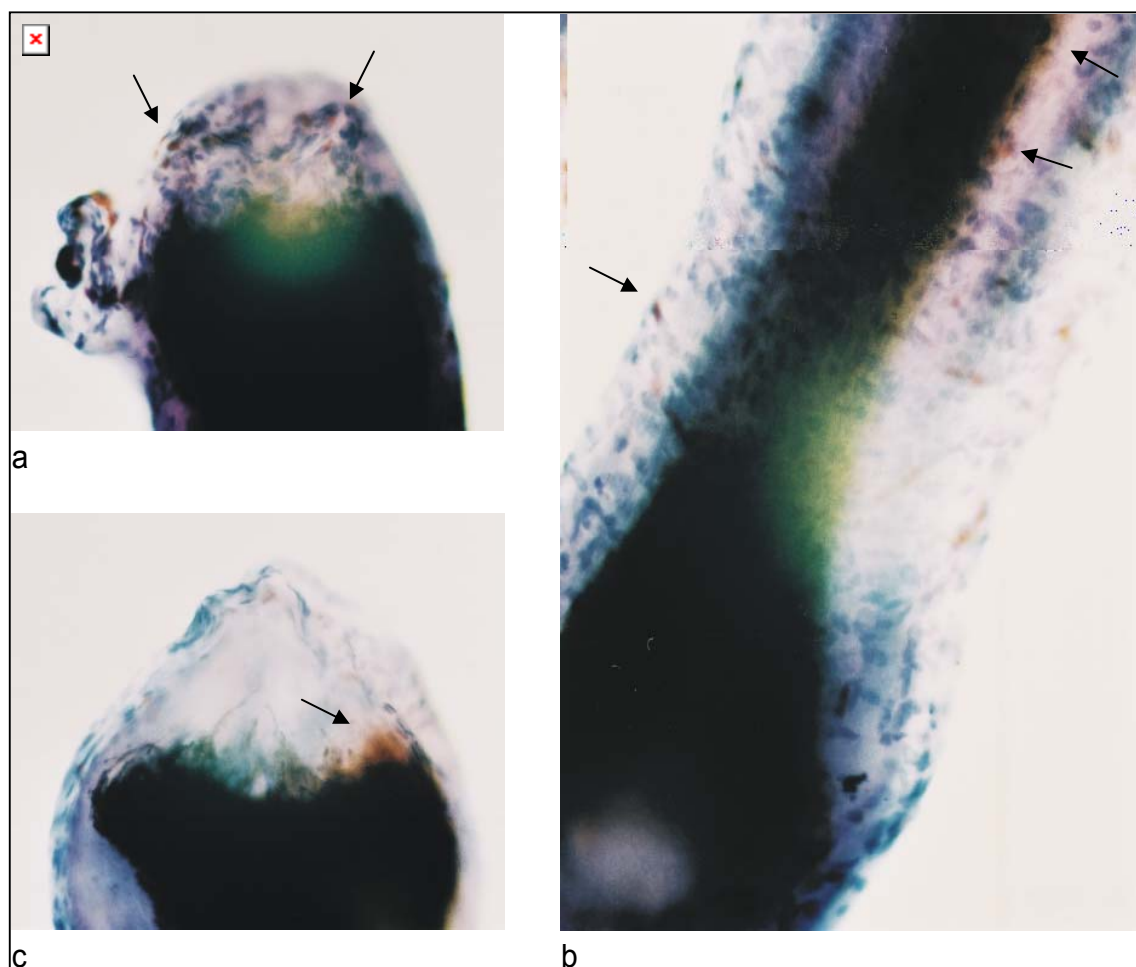


Abb. 9a-c: Anfärbung von Ki-67 ( → )

- a) in der Wurzelscheide eines in Williams E Medium kultivierten Follikels
- b) in der Papille und der Wurzelscheide eines in Me 30 µmol kultivierten Follikels
- c) in der Papille eines in Me+P 30 µmol kultivierten Follikels.

Insgesamt wurde nur eine geringe Anzahl angefärbter Zellen beobachtet, was eine differenzierte Beurteilung mit Schlußfolgerungen auf verschiedenes Wachstumsverhalten der Haarfollikel in den untersuchten Testmedien erschwerte. Bei 8 von 10 Follikeln, die zuvor in Me 30  $\mu\text{mol}$  kultiviert wurden, waren Anfärbungen erkennbar. Diese zeigten sich an 4 Follikeln im Bereich der Matrix, an 4 Follikeln im Bereich der Wurzelscheiden und an 5 Follikeln an der Papille. Die übrigen 2 Haarfollikel ließen keine Färbung erkennen.

An 3 von 9 der in Williams E Medium kultivierten Follikel waren ebenfalls im Bereich von Matrix, Wurzelscheide und Papille Färbungen nachweisbar, die etwa der Anzahl der in Me 30  $\mu\text{mol}$  nachgewiesenen Anfärbungen entsprachen. Ein Haarfollikel war aufgrund von Luftüberlagerung nicht auswertbar. Die restlichen 4 Follikel wiesen keinerlei Anfärbungen auf.

Die geringste Anzahl angefärbter Zellen zeigte sich in Me+P 30  $\mu\text{mol}$  kultivierten Follikeln. Färbungen waren an 4 von 6 Follikeln erkennbar.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion der Versuchsergebnisse**

#### **5.1.1. Wachstum im Haarorgankulturmodell**

Im Verlauf der Untersuchungen war ein Wachstum der Haarfollikel unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nachweisbar. Es wurde eine signifikante Längenzunahme bis Tag 10 nachgewiesen. Dies bekräftigt vorausgegangene Untersuchungen, in denen ein Wachstum menschlicher Haarfollikel bei Kultivierung in angereichertem Williams E Medium beobachtet wurde. [ Philpott et al. 1990 ]

Während der Wachstumszeit verminderte sich deutlich die tägliche Längenzunahme. Vorausgegangene In-vitro-Studien wiesen nach, daß innerhalb der ersten zwei bis drei Tage die Matrixzellproliferation, die Differenzierung der Keratinozyten und die Haarschaftproduktion vergleichbar mit den Vorgängen in vivo sind. Nach dieser Zeit sinkt die Zahl proliferierender Zellen und zunehmend auch die Differenzierungsfähigkeit. [ Harmon et al. 1994 ]

Im Vergleich zu früheren Studien ergaben sich jedoch Abweichungen im täglichen Haarwachstum. Sowohl in In-vivo- als auch in In-vitro-Studien konnte innerhalb der ersten 4 Tage eine Wachstumsrate von 0,25 bzw. 0,3 mm/d beobachtet werden. [ Myers et al. 1951; Harmon et al. 1994; Philpott et al. 1991 ]

Dieser Längenzuwachs konnte in den vorliegenden Versuchen nach dem ersten Untersuchungstag mit 0,26 mm erreicht werden. Insgesamt wurde in den ersten vier Tagen aber nur ein durchschnittlicher Längenzuwachs von 0,18 mm/d gemessen. Dafür sind verschiedene Ursachen zu diskutieren, zum Beispiel ungleiche Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Personen, denen die Kopfhaut entnommen wurde, Mikroverletzungen an den Haarfollikeln durch die Präparationstechnik, Verunreinigungen trotz keimarmen Arbeitens und eine zu lange Aufbewahrungszeit der Kopfhautbiopate vor Präparationsbeginn. Die Mehrzahl der Haarfollikel wurde etwa 40 Stunden bis zur Bearbeitung aufbewahrt. Auch hinsichtlich des Anagenstadiums unterscheiden sich die



Haarfollikel. Während Follikel im frühen Anagenstadium noch ausgeprägte Proliferationsfähigkeit beweisen, ist dies bei Follikeln im späten Anagenstadium eingeschränkt. [ Paus 1998 ]

Weiterhin war eine starke Abnahme der Anzahl wachsender Haarfollikel im Untersuchungsverlauf zu erkennen. Ursachen werden im Trauma der Präparation, im Nährstoffangebot bzw. in den Kulturbedingungen gesehen. [ Ibraheem et al. 1994; Philpott et al. 1992 ] Insgesamt war ein Wachstum einzelner Follikel jedoch bis zu 16 Tagen zu beobachten. Dies gleicht Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen ein Wachstum bis zu 17 Tagen nachgewiesen wurde. [ Philpott et al. 1996 ]

Im Verlauf der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zeigten sich in den einzelnen Präparationsansätzen erhebliche Schwankungen im Wachstumsverhalten. Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, wurde im Basismedium eine große Anzahl von Haarfollikeln getestet (  $n = 161$  ). Andere Arbeitsgruppen beschrieben eine Follikelanzahl von  $n = 36$  bzw.  $n = 8 - 12$  als ausreichend. [ Harmon et al. 1995; Philpott et al. 1990 ]

### **5.1.2. Haarfollikelwachstum in verschiedenen Melatoninmedien**

Die vorliegende Studie untersuchte erstmals den Einfluß von Melatonin auf das Wachstum menschlicher Haarfollikel in vitro.

Im Plasma des Menschen liegt der Melatoninspiegel zwischen 10 und 250 pg/ml ( entspricht einer Melatoninkonzentration von 0,04 - 1,08 fmol ). Für die Untersuchung in vitro wurden Melatoninmedien in  $\mu\text{mol}$ - und  $\text{mmol}$ -Konzentrationen verwendet. Dabei waren unterschiedliche Wirkungen auf das Längenwachstum der Follikel in Abhängigkeit von der Melatoninkonzentration erkennbar. [ Fischer et al. 2000 ]

Ein stärkeres Wachstum im Vergleich zur Basissubstanz Williams E Medium zeigte sich in Me 30  $\mu\text{mol}$ , jedoch war die Wachstumsförderung nur innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant. Eine stimulierende Wirkung von Melatonin

wurde bereits im In-vitro-Modell an Haarfollikeln von Kaschmirziegen beobachtet. Dabei wurden je 60 Haarfollikel über 120 Stunden ( 5 Tage ) in Melatoninkonzentrationen von 0, 50, 150, 300 und 600 ng/l ( entspricht Melatoninkonzentrationen von 0; 0,26; 0,65; 1,29 und 2,58 nmol ) beobachtet. [ Ibraheem et al. 1994 ] Der Normbereich des Plasmamelatoninspiegel bei Ziegen liegt bei 100 – 300 ng/l ( entspricht einer Melatoninkonzentration von 0,43 – 1,29 nmol ). [ Waldhauser et al. 1983 ] In den Untersuchungsreihen zeigten sich in Melatonin der Konzentrationen 150, 300 und 600 ng/l signifikant höhere Wachstumsraten als in Medium ohne Melatonin. [ Ibraheem et al. 1994 ]

Im weiteren Untersuchungsverlauf an humanen Haarfollikeln ließ Melatonin in den Konzentrationen 20 µmol, 40 µmol, 3 mmol und 5 mmol keinen Unterschied im Wachstumsverhalten im Vergleich zu Williams E Medium erkennen. Dies entspricht Beobachtungen von Winder et al., die den Einfluß von Melatonin 1,2 nmol auf Schaffellfollikel in vitro über einen Zeitraum von 4 Tagen untersuchten. [ Winder et al. 1995 ] Der Plasmamelatoninspiegel dieser Schafe liegt in Abhängigkeit von Tages- und Jahreszeit bei 0 - 400 pmol. [ Morgan 1990 ] Dabei zeigte sich kein signifikanter Wirkungsunterschied von Melatonin auf Längenwachstum und Lebensfähigkeit der Follikel im Vergleich zu Williams E Medium. Unzureichende Kulturbedingungen für diese Follikel und möglicherweise zu kurze Beobachtungszeiten sind als Gründe vermutet worden. Andererseits könnten Follikel dieser Schafrassen unempfindlich gegenüber Melatonin auch in vivo sein. [ Winder et al. 1995 ]

In den vorliegenden Ergebnissen zeigten Me 1 mmol und 2 mmol eine Hemmung des Follikelwachstums. Ein hemmender Einfluß von Melatonin auf das Haarwachstum wurde bereits in vivo an Schafen, Ziegen und Waschbären beobachtet. [ Foldes et al. 1991; McCloghry et al. 1992; Xiao et al. 1995 ]

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, daß Melatonin in verschiedenen Konzentrationen einen unterschiedlichen Einfluß auf das Wachstum menschlicher Haarfollikel in vitro hat. Aus den Ergebnissen kann man schlußfolgern, daß es keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Melatonin und dem Follikelwachstum gibt. Es fanden sich bessere Wachstumsergebnisse in niedrigeren Konzentrationen. In weiteren Untersuchungen sollten gegebenenfalls noch kleinere Melatoninkonzentrationen getestet werden.

Da eine Wirkung von Melatonin auf das Haarwachstum sowohl in In-vivo-Studien an verschiedenen Tierarten als auch in vitro an tierischen und menschlichen Haarfollikeln gezeigt wurde, ist eine direkte Wirkung von Melatonin am Haarfollikel zu vermuten. [ Mitchell et al. 1991; Teh et al. 1992; Ibraheem et al. 1994 ] Zuvor war man von einer indirekten Wirkungsweise zum Beispiel über die Veränderung des Prolaktinspiegels ausgegangen. [ Prandi et al. 1987; Maeda et al. 1988 ]

Um eine mögliche direkte Wirkung von Melatonin am Haarfollikel zu untersuchen, wurde die Hemmbarkeit des stimulierenden Einflusses von Melatonin mit Hilfe des Melatoninantagonisten 4-PDOT überprüft. Dabei war eine signifikante Hemmung des Follikelwachstums gegenüber Me 30  $\mu$ mol und Williams E Medium zu erkennen. Dies läßt einen rezeptorvermittelten Wirkungsmechanismus am Haarfollikel vermuten.

In Tieruntersuchungen an Mäusen wurden durch einen autographischen Nachweis Bindungsstellen von  $^3\text{H}$ -Melatonin am Haarbulbus, vor allem in der äußeren Wurzelscheide lokalisiert. [ Slominski et al. 1994 ] Dagegen konnten Untersuchungen an Schafen und Ziegen keine spezifischen Bindungen von  $^{125}\text{I}$ -Melatonin nachweisen. [ Foldes et al. 1991; Dicks et al. 1996 ] In weiterführenden Studien sollte versucht werden, spezifische Bindungsstellen auch an menschlichen Haarfollikeln zu lokalisieren.

### **5.1.3. Nachweis der Proliferationsfraktion in Haarfollikeln nach Kultivierung in verschiedenen Medien**

In der vorliegenden Untersuchung wurden komplette Haarfollikel zur Differenzierung verschiedenen Wachstumsverhaltens einem immunhistochemischen Verfahren unterzogen. Proliferierende Zellen stellen sich durch Anfärbung des Antigens Ki-67 dar.

Es wurden Haarfollikel aus drei verschiedenen Testmedien verwendet. In vorhergehenden Untersuchungen war an Follikeln nach Kultivierung in Me+P 30  $\mu$ mol ein signifikant geringeres Wachstum als in Williams E Medium und Me 30  $\mu$ mol zu beobachten gewesen, zwischen Basismedium und Me 30  $\mu$ mol

gab es an Tag 4 keine signifikanten Unterschiede. Es wurde nun überprüft, ob diese Unterschiede auch an der Anzahl proliferierender Zellen erkennbar waren.

Insgesamt waren in den Präparaten nur wenige Anfärbungen nachweisbar, die jedoch nicht nur auf ein geringes Vorhandensein proliferierender Zellen am Tag 4 zurückzuführen sein könnten, sondern auch auf eine unzureichende Markierung bzw. Anfärbung dieser Zellen aufgrund methodischer Mängel.

Wie schon in den zuvor durchgeführten Untersuchungen konnten zwischen Me 30  $\mu\text{mol}$  und Williams E Medium keine Unterschiede in der Anzahl proliferierender Zellen nachvollzogen werden. Kaum Anfärbungen wurden an Follikeln in Me+P 30  $\mu\text{mol}$  beobachtet. Vergleichbar mit Angaben in der Literatur waren Zellen im Bereich von Papille, Matrix und Wurzelscheide markiert. [ Miyauchi et al. 1990 ] Dies läßt erkennen, daß das Wachstum des Haarfollikels eine wesentliche Aufgabe der genannten Haarfollikelanteile ist.

## **5.2. Diskussion der Methodik**

### **5.2.1. Anwendung des Haarorgankulturmodells**

In dieser Studie wurden aufgrund der geringen Verfügbarkeit menschlicher Kopfhaut keine Beschränkungen hinsichtlich des Geschlechtes, des Alters, der Erkrankungen der Personen und der Entnahmestelle am Kopf festgelegt. Dies differiert mit Untersuchungen in der Literatur, in denen Biopate von 30 - 35 jährigen gesunden Frauen verwendet wurden. [Philpott et al. 1990; Philpott et al. 1991; Harmon et al. 1994]

Fibrosierte, unterblutete bzw. verletzte Kopfhaut beeinträchtigt die Kopfhautqualität und beschränkt die Anzahl verwendbarer Haarfollikel eines Biopates zum Teil erheblich. Informationen über den Gesundheitszustand der Personen, über Haarerkrankungen, Behaarungszustand und Medikamenteneinnahme wurden nicht erhoben. Diese Informationen könnten aber für die Studiendurchführung bzw. -auswertung von Bedeutung sein, da Stoffwechsel-

störungen, wie zum Beispiel der Diabetes mellitus oder eine Hyperthyreose, aber auch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Thyreostatika oder von Antikoagulantien das Haarwachstum beeinflussen. [ Champion et al. 1992 ] Durch existente Haarerkrankungen können Untersuchungsergebnisse beeinträchtigt werden. Ursachen für die unterschiedlichen Wachstumsergebnisse in unserer Studie im Vergleich zu Untersuchungen in der Literatur könnten in ungleichen Ausgangsbedingungen liegen. Durch strengste Auswahl des Untersuchungsmaterials mit festgelegten Anforderungen an die Personen, denen die Kopfhaut entnommen wird, könnten negative Einflußfaktoren verringert werden. Es sollten nur junge, gesunde Personen an der Untersuchung teilnehmen und die Kopfhaut der Okzipitalregion, die androgeninsensitiv ist, entnommen werden. [ Champion et al. 1992 ]

Die Aufbewahrungszeit der Kopfhaut vor Präparationsbeginn umfaßte aus organisatorischen Gründen eine Spanne von einer Stunde bis zu zwei Tagen. In der Literatur sind Lagerungszeiten vor der Verarbeitung bis 36 Stunden beschrieben. [Harmon et al. 1994] Unterschiede im Wachstumsergebnis zwischen verschieden lang gelagerten Präparaten waren dabei nicht offensichtlich und sind auch nicht beschrieben worden. Jedoch ist es für weitere Studien empfehlenswert zu untersuchen, ob die sofortige Bearbeitung der Kopfhaut die Wachstumsergebnisse verbessern und somit die Methodik optimieren würde.

Bei der Präparation müssen die Haarfollikel sehr sorgfältig aus der Kopfhaut extrahiert werden, da Schädigungen v.a. im Papillenbereich das spätere Wachstum erheblich beeinträchtigen können. [ Bassakus et al. 1989 ] Bei fibrosierter Kopfhaut gestaltete sich die Follikelextraktion jedoch schwieriger, so daß dem Follikel möglicherweise Minimalverletzungen zugefügt wurden, die das spätere Wachstum einschränkten.

Die verminderte Wachstumsrate könnte auch durch unterschiedliche Studienverlaufsbedingungen mitverursacht sein. Gegebenenfalls sollten in weiterführenden Untersuchungen die Zeiträume für Messungen und Medienwechsel, in denen die Haarfollikel in einer kühleren Umgebung lagern, noch weiter minimiert werden. Harmon et al. führte den Medienwechsel gewöhnlich nur alle 3 - 4 Tage durch. [ Harmon et al. 1994 ] Möglicherweise ist auch dieser Zeit-

raum ausreichend, um dem Haarfollikel optimale Wachstumsbedingungen zu gewähren. Die Gefahr der Schädigung beim Medienwechsel wäre durch die verminderte Häufigkeit der Prozedur verringert. Das versehentliche Ansaugen der Follikel beim Medienwechsel, das eine Verletzungsgefahr darstellt, kann möglicherweise durch eine andere Methodik verhindert werden.

### **5.2.2. Anwendung des Nachweises von Ki-67 am Haarfollikel**

Der Nachweis proliferierender Zellen im Haarfollikel gestaltete sich verhältnismäßig schwierig. In der vorliegenden Untersuchung kamen komplette Haarfollikel als Untersuchungsmaterial zur Anwendung. Frühere Untersuchungen wurden an Mikrolängs- und -querschnitten von Haarfollikeln ( 5  $\mu\text{m}$  bzw. 8  $\mu\text{m}$  ) durchgeführt. [ van Baar et al. 1990, Miyauchi et al. 1990 ]

Bei der Betrachtung der gefärbten Haarfollikel war im Gegensatz zu diesen Untersuchungen eine deutlich geringere Anzahl markierter Zellen zu sehen. Das könnte auf eine unzureichende Durchdringung des Antikörpers bzw. des Farbstoffes insbesondere durch die äußere und innere Wurzelscheide des Haarfollikels zurückzuführen sein.

In vorausgegangenen Studien wurden frische Gewebeproben bei – 80 °C auf Trockeneis tiefgefroren und bis zur immunhistochemischen Untersuchung bei dieser Temperatur aufbewahrt. Nach Erstellung der Mikroschnitte erfolgte die Fixierung in Aceton. [ Commo et al. 1997 ] Eventuell würde eine entsprechende Bearbeitung der Follikel die Zellen besser in ihren Wachstumsstadien fixieren und somit die Ergebnisse verbessern.

## 6. Zusammenfassung

Die Haut und ihre Anhangsgebilde sind Wirkungsort zahlreicher Hormone und Neuropeptide. Melatonin, ein Hormon der Zirbeldrüse, stellt sich unter anderem als wichtiger Mediator bei der Kontrolle saisonaler Fellveränderungen vieler Säugetiere dar. In verschiedenen Untersuchungen steigerten Melatoningaben das Fellwachstum mehrerer Tierarten. [ Rose et al. 1987; Pearson et al. 1989; Welch et al. 1990; Nixon et al. 1993; Gower et al. 1994; Nixon et al. 1995 ] Auch in vitro wurde ein stimulierender Effekt von Melatonin auf das Follikelwachstum beobachtet. [ Ibraheem et al. 1994 ] Andere Arbeitsgruppen fanden im Gegensatz dazu einen hemmenden Effekt von Melatonin auf das Fellwachstum. [ Lincoln et al. 1980; McDonald et al. 1987; Sutherland et al. 1990; Foldes et al. 1992; McCloghry et al. 1992; Foldes et al. 1993; Xiao et al. 1995; ] An menschlichem Haar liegen noch keine Untersuchungen zur Melatoninwirkung vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden Anagenhaarfollikel aus menschlichen Kopfhautbiopaten mit Hilfe eines Dissektionsmikroskopes extrahiert. Die Follikel wurden einzeln in 24-Well-Mikrotiterplatten in 500 µl angereichertem Williams E Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>/ 95% Luft kultiviert. [ Philpott et al. 1996 ] Williams E Medium, Me 20 µmol, 30 µmol, 40 µmol, 1 mmol, 2 mmol, 3 mmol und 5 mmol und Me+P 30 µmol wurden als Testmedien verwendet. Es erfolgten tägliche Längenmessungen der Haarfollikel bis zum Wachstumsstop.

In den Versuchen war nach dem Haarorgankulturmodell von *Philpott et al.* ein signifikantes Wachstum menschlicher Haarfollikel nachvollziehbar, jedoch mit einer geringeren Längenzunahme als in vorausgegangenen Studien. [ Myers et al. 1951; Harmon et al. 1994, Philpott et al. 1996 ] Ursachen könnten ungleiche Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Kopfhautspender, der Qualität der Biopate und der Präparationstechnik sein. Auch Verunreinigungen oder ungünstigere Kulturbedingungen müssen ursächlich in Betracht gezogen werden.

Die untersuchten Melatoninmedien wiesen verschiedenartige Wachstumsergebnisse auf. Me 30 µmol zeigte den besten Wachstumsverlauf, jedoch war der Unterschied nur an Tag 2 signifikant. In Me 1 mmol und 2 mmol war dagegen eine Wachstumshemmung zu beobachten. Die übrigen Melatoninmedien zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wachstum in Williams E Medium.

Diese unterschiedliche Wirkungsweise von Melatonin auf das Haarwachstum wurde auch schon in In-vitro-Untersuchungen an Tierfellfollikeln gezeigt. [ Ibraheem et al. 1994; Winder et al. 1995 ]

Me+P 30  $\mu\text{mol}$  zeigte eine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zu Me 30  $\mu\text{mol}$  allein und zu Williams E Medium. Dies unterstützt die Hypothese, daß Melatonin nicht nur indirekt über die Veränderung zum Beispiel des Prolaktinspiegels, sondern auch direkt über spezifische Bindungsstellen am Haarfollikel wirken könnte. Hinweise dafür wurden schon durch den Nachweis der Bindung von  $^3\text{H}$ -Melatonin an Mäusefollikeln gegeben. [ Slominski et al. 1994 ]

Durch den Nachweis von Ki-67-Antigen sollten unterschiedliche Wachstumstendenzen in verschiedenen Testmedien durch Darstellung der Proliferationszellfraktion veranschaulicht werden. Follikel nach Kultivierung in Williams E Medium und Me 30  $\mu\text{mol}$  wiesen etwa die gleiche Anzahl gefärbter Zellen im Bereich von Wurzelscheide, Matrix und Papille auf. An Follikeln in Me+P 30  $\mu\text{mol}$  zeigten sich kaum Anfärbungen in diesen Bereichen. Die Methodik muß für komplette Haarfollikel jedoch als ungeeignet bewertet werden, da nur wenige Zellen angefärbt wurden. Die Verwendung von Mikroschnitten scheint für die Anfärbung mit Ki-67 aussagekräftigere Ergebnisse zu liefern.

In weiterführenden Untersuchungen sollten optimale Voraussetzungen hinsichtlich der Haarfollikel, ihrer Präparation und Kultivierung geschaffen werden sowie das Follikelwachstum in Melatonin geringerer Konzentration als in der durchgeführten Studie untersucht werden. Weiterhin bleibt zu klären, ob mit geeigneten Verfahren spezifische Bindungsstellen von Melatonin an menschlichen Haarfollikeln zu lokalisieren sind.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Allain D, Ravault JP, Panaretto BAQ, Rougeot J: Effects of pinealectomy on photoperiodic control of hair follicle activity in the limousine ram: possible relationships with plasma prolactin levels. *J Pineal Res* 1986, 3: 25-32
2. Ando M, Kawashims T, Kobayashi H, Ohkawara A: Proliferating cells in the normal and psoriatic epidermis detected by Ki-67 monoclonal antibody. *J Invest Dermatol* 1989, 92: 395
3. Arendt J: The pineal. In: Touitou Y, Haus E: *The biological rhythms in clinical and laboratory medicine*. Springer Verlag, Berlin, 1992, 348-362
4. van Baar HMJ, Perret CM, Schalkwijk J: Cryosectioning of hair follicles: an improved method using liquid nitrogen conduction freezing. *Acta Derm Venereol* 1990, 70: 335-338
5. van Baar HMJ, Perret CM, van Vlijmen IM, van de Kerkhof PCM, Happle R: Abnormal expression of Ki-67 antigen in hair follicle of alopecia areata. *Acta Derm Venereol* 1992, 72: 161-164
6. van Baar HMJ, van Vlijmen IM, Ramaekers FC, van Muijen GN, Troyanovsky SM, Perret CM, van de Kerkhof PC: Cytokeratin expression in alopecia areata hair follicles. *Acta Derm Venereol* 1994, 74: 28-32
7. Bassukas ID, Hornstein OP: Effects of plucking on the anatomy of the anagen hair bulb. *Arch Dermatol Res* 1989, 281: 188-192
8. Benninghoff A: *Anatomie 2*. Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 15. Auflage 1994, 804
9. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH: *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag, Berlin, 1994, 661-664

10. Champion RH, Burton JL, Ebling FJG: Textbook of Dermatology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992, 5<sup>th</sup> Edition 4: 2534-2550; 2571-2595
11. Commo S, Bernard BA: Immunohistochemical analysis of tissue remodeling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. Br J Derm 1997, 137: 31-38
12. Dicks P, Morgan CJ, Morgan PJ, Kelly D, Williams LM: The localisation and characterisation of insulin-like growth factor-I receptors and the investigation of melatonin receptors on the hair follicles of seasonal and non-seasonal fibre-producing goats. J Endocr 1996, 151: 55-63
13. Dubocovich MI, Masana MI, Jacob S, Sauri DM: Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel 1a and Mel 1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML 1 presynaptic heteroreceptor. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1997, 355: 365-375
14. Dubocovich MI, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI: Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. The FASEB Journal 1998, 12: 1211-1220
15. Egawa K, Yoshimura K, Kageshita T, Ono T: Cell kinetics in human anagen hair and hair follicles studied with bromodeoxyuridine ( BrdU ) and anti-BrdU monoclonal antibody. Jpn J Dermatol 1988, 98: 61-64
16. van Erp PEJ, Groenendal H, Bauer FW, Rijzewijk JJ: Growth fraction in epidermal skin disorders determined by the monoclonal antibody Ki-67. J Invest Dermatol 1997, 89: 313
17. Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P: Melatonin in der Dermatologie. Hautarzt 1999, 50: 5-11

18. Fischer TW, Fischer A, Knöll B, Hipler UC, Elsner P: Melatonin in low doses enhances in vitro human hair follicle proliferation and inhibits hair growth in high doses. Arch Derm Res 2000, 292: 147
19. Foldes A, McDonald BJ, Hoskinson RM: Neuroendocrine control of cashmere growth by melatonin. European Journal of Neuroscience 1990, 3: Abstr.1185
20. Foldes A, Maxwell CA, Hollis DE, McCloghry CE: Involvement of melatonin in wool follicle development in Merino sheep. Advances in Pineal Research 1991, 6: 235-244
21. Foldes A, Hoskinson RM, Baker P, McDonald BJ, Maxwell CA, Restall BJ: Effect of immunization against, melatonin on seasonal fleece growth in feral goats. J Pineal Res 1992, 13: 85-94
22. Foldes A, Maxwell CA: Effects of pinealectomy and plane of nutrition on wool growth in merino sheep. J Pineal Res 1993, 15: 27-34
23. Gawkrödger D: Dermatologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1995: 6
24. Gebbie FE, Forsyth IA, Arendt J: Effects of exogenous melatonin or bromocriptine on moulting and prolactin in goats. Journal of Reproduction and Fertility 1992, 9: 4
25. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983, 6: 13-20
26. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analyses of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 1984, 133: 1710-1715

27. Gower BA, Hadjipanayis C, Nagy TR, Stetson MH: Response of collared lemmings to melatonin: II. infusions and photoperiod. *J Pineal Res* 1994, 17: 185-194
28. Hardeland R: Melatonin: Multiple functions in signaling and protection. In: Altmeyer P., Hoffmann K., Stücker M.: *Skin cancer and UV radiation*. Springer Verlag, Berlin, 1997, 186-198
29. Harmon CS, Nevins TD: Hair fibre production by human hair follicles in whole-organ culture. *Br J Derm* 1994, 130: 415-423
30. Harmon CS, Nevins TD, Bollag WB: Protein kinase C inhibits human hair follicle growth and hair fibre production in organ culture. *Br J Derm* 1995, 133: 686-693
31. Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, Ewen S: Growth and viability of secondary hair follicles of the Angora goat cultured in vitro. *J Anat* 1993, 182: 231-238
32. Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, Ewen S: Growth of secondary hair follicles of the Cashmere goat in vitro and their response to prolactin and melatonin. *J Anat* 1994, 185: 135-142
33. Imai R, Miura Y, Mochida K: Organ culture conditions of human hair follicles. *J Dermatol Sci* 1992, 3: 163-171
34. Imai R, Jindo T, Miura Y: Organ culture of human hair follicles in serum-free medium. *Arch Dermatol Res* 1993, 284: 466-471
35. Jahoda CAB, Oliver RF: The dermal papilla and the growth of hair. In: Orfanos CE, Happle R: *Hair and hair diseases*. Springer Verlag, Berlin, 1990, 2: 19-44
36. Jan JE, Espezel H, Appleton RE: The treatment of sleep disorders with melatonin. *Dev Med Child Neurol* 1994, 36: 97-107

37. Jockenhövel F, Lerchl A, Allolio B: Hormone gegen das Altern – Möglichkeiten und Grenzen. Dt Ärztebl 2001, 98: 2041-2045
38. Kondo S, Hozumi Y, Aso K: Organ culture of human scalp hair follicles: Effect of testosterone and oestrogen on hair growth. Arch Dermatol Res 1990, 282: 442-445
39. Korf HW, Moller M: The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. Pin Res Rev 1983, 2: 41-86
40. Li L, Margolis LB, Paus R, Hoffmann RM: Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term, gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 8764-8768
41. Lincoln GA, Klandorf H, Anderson N: Photoperiodic control of thyroid function and wool and horn growth in rams and the effect of cranial sympathectomy. Endocrinology 1980, 107: 1543-1548
42. Maeda KI, Mori Y, Kano Y: Involvement of melatonin in the seasonal changes of the gonadal function and prolactin secretion in femal goats. Reproduction Nutrition Development 1988, 28: 487-497
43. McCloghry E, Foldes A, Hollis D, Rintoul A, Maxwell C, Downing J, Baker P, Kennedy J, Wynn P: Effects of pinealectomy on wool growth and wool follicle density in Merino sheep. J Pineal Res 1992, 13: 139-144
44. Mc Donald BJ, Hoey WA, Hopkins PS: Cyclical fleece growth in cashmere growth. Aust J Agric Res 1987, 38: 597-609
45. Mitchell RJ, Betteridge K, Gurnsey MP, Welch RAS: Fibre growth of cashmere-bearing goats given melatonin in late autumn and winter. New Zealand J Agric Res 1991, 34: 419-426

46. Miyauchi S, Hashimoto K, Miki Y: The innermost cell layer of the outer root sheath is positive with Ki-67. *J Invest Dermatol* 1990, 95: 393-396
47. Morgan PJ: Novel neuroendocrine pathway regulates seasonal reproduction. The Rowett Research Institute Annual report 1990, Aberdeen; 1990: 10-17
48. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW: Harper's Biochemistry. Appleton & Lange, Stamford, 24. Auflage 1996, 337-339
49. Myers RJ, Hamilton JB: Regeneration and rate of growth of hairs in man. *Ann NY Acad Sci* 1951, 53: 562-568
50. Nixon AJ, Choy VJ, Parry AL, Pearson AJ: Fibre growth initiation in hair follicles of goats treated with melatonin. *J Exp Zool* 1993, 267: 47-56
51. Nixon AJ, Ashby MG, Saywell DP, Pearson AJ: Seasonal fiber growth cycles of ferrets ( *Mustela putorius furo* ) and long-term effects of melatonin treatment. *J Exp Zool* 1995, 272: 435-445
52. Orfanos CE: Haar und Haarkrankheiten. Fischer-Verlag, Stuttgart, 1979, 2: 18-19; 78-87
53. Paterson M, Foldes A: Melatonin and farm animals: endogenous rhythms and exogenous applications. *J Pineal Res* 1994, 16: 167-177
54. Paus R, Czarnecki BM: Neue Perspektiven in der Haarforschung: auf der Suche nach der „biologischen Uhr“ des Haarzyklus. *Hautarzt* 1992, 43: 264-271
55. Paus R: Principles of hair cycle control. *J Dermatol* 1998, 25: 793-802
56. Paus R, Cotsarelis G: The biology of the hair follicle. *The New England Journal of Medicine* 1999, 341: 491-497

57. Pearson AJ, Ashby MG: Effects of melatonin on body weight, appetite and seasonal fur growth in the ferret. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1989, 49: 47-52
58. Pearson AJ, Parry AL, Ashby MG, Choy VJ, Wildermoth JE: Inhibitory effects of increased photoperiod on wool follicle growth. *J Endocr* 1996, 148: 157-166
59. Philpott MP, Green MR, Kealey T: Studies on the biochemistry and morphology of freshly isolated and maintained rat hair follicles. *J Cell Sci* 1989, 93: 409-418
60. Philpott MP, Green MR, Kealey T: Human hair growth in vitro. *J Cell Sci* 1990, 97: 463-471
61. Philpott MP, Westgate GE, Kealey T: An in vitro model for the study of human hair growth. *Ann N Y Acad Sci* 1991, 642: 148-164
62. Philpott MP, Green MR, Kealey T: Rat hair follicle growth in vitro. *Br J Dermatol* 1992, 127(6): 600-607
63. Philpott MP, Sanders DA, Westgate GE, Kealey T: Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J Dermatol Sci Suppl* 1994, 55-72
64. Philpott MP, Sanders DA, Kealey T: Whole hair follicle culture. *Dermatologic Clinics* 1996, 14: 595-607
65. Prandi A, Romagnoli G, Chiesa F, Tamanini C: Plasma prolactin variations and onset of ovarian activity in lactating anoestrous goats given melatonin. *Anim Repr Sci* 1987, 13: 291-297
66. Reiter RJ: The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrinol Rev* 1980, 1: 109-131
67. Reiter RJ: Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 1998, 14: 691-696

68. Reiter RJ, Tan DX, Qui WB: Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998, 19: 575-581
69. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D: Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 854: 410-424
70. Rose J, Oldfield J, Adair J: Induction of winter fur growth in mink (*Mustela Vison*) with melatonin. *J Anim Sci* 1984, 58: 57-61
71. Rose J, Oldfield J, Stormshak F: Apparent role of melatonin and prolactin in initiating winter fur growth in mink. *General and comparative endocrinology* 1987, 65: 212-215
72. Rougeot J, Allain D, Martinet L: Photoperiodic and hormonal control of seasonal coat changes in mammals with special reference to sheep and mink. *Acta Zool Fennica* 1984, 171: 13-18
73. Sachs L: *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin, 1992, 178-180; 380-391; 410-413
74. Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM: Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 1986, 3: 379-388
75. Schell H: *Erkrankungen der Haare*. W. Kohlhammer Verlag, Stuttgart, 1997: 1-14
76. Scott T, Eagleson M: *Consise encyclopedia of biochemistry*. De Gruyter Verlag, Berlin, 2. Auflage 1988, 362
77. van Scott EJ, Ekel TM, Auerbach R: Determinants of rate and kinetics of cell division in scalp hair. *J Invest Dermatol* 1963, 41: 269-273



78. Skene DJ, Deacon S, Arendt J: Use of melatonin in circadian rhythm disorders and following phase shifts. *Adv Neurobiol Exp* 1996, 56: 359-362
79. Slominski A, Chassalevris N, Mazurkiewicz J, Maurer M, Paus R: Murine skin as a target for melatonin bioregulation. *Exp Dermatol* 1994, 3: 45-50
80. Soyer HP, Smolle J, Smolle-Juettner FM, Kerl H: Proliferation antigens in cutaneous melanocytic tumors – an immunohistochemical study comparing the transferrin receptor and the Ki-67 antigen. *Dermatologica* 1989, 179: 3-9
81. Sutherland SRD, Henniawati, Restall BJ, Hoskinson RM: Cashmere growth in Australian goat does immunised against melatonin. *Animal production in Australia* 1990, 18: 380-383
82. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993, 1: 57-60
83. Teh TH, Jia ZH, Ogden KD: Comparison of cashmere down production during natural and artificial induced seasons. Recent advances in goat production proceedings of the V<sup>th</sup> International Conference on goats, New Delhi, India 1992: 1641-1647
84. Waldhauser F: The secretion and actions of melatonin. In: Waldhauser F: *Biochemical actions of hormones*. Acad Press 1983, 10: 187-225
85. Waldhauser F, Saletu B, Trinchard-Lugan I: Sleep laboratory investigations on hypnotic properties of melatonin. *Psychopharmacology* 1990, 100: 222-226
86. Welch RAS, Gurnsey MP, Betteridge K, Mitchell RJ: Goat fibre response to melatonin given in spring in two consecutive years. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 1990, 50: 335-338

87. Westgate GE, Gibson WT, Kealey T, Philpott MP: Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in a serum-free medium. *Br J Derm* 1993, 129: 372-379
88. Williams GM, Weisburger EK, Weisburger JH: Isolation and long-term culture of epithelial like cells from rat liver. *J Exp Cell Res* 1971, 69: 106-112
89. Winder LM, Scobie DR, Bray AR, Bickerstaffe R: Wool growth rate in vitro is independent of host animal nutrition, season, and the potential mediators of photoperiodic, melatonin and prolactin. *J Exp Zool* 1995, 272: 446-454
90. Xiao Y, Forsberg M, Laitinen JT, Valtonen M: Effects of melatonin implants in spring on testicular expression and moulting in adult male raccon dogs. *J Pineal Res* 1995, 105: 9-15

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
Me	Melatonin
Me + P	Melatonin in Kombination mit 4-PDOT
4-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
v.a.	vor allem

### 8.2. Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen

<b>Abbildungen:</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1: Aufbau des Haarfollikels	2
Abb. 2: Haarzyklus	3
Abb. 3: Dissektionmikroskop Zeiss Stemi SV 11	11
Abb. 4: Mikrotiterplatte	13
Abb. 5: Untersuchungsablauf	14
Abb. 6: Zeiss-Telaval-Auflichtmikroskop mit skaliertem Meßokular; 2,5 x Objektiv	15
Abb. 7: Nachweis von Ki-67 im Zellzyklus	16
Abb. 8: Haarfollikel am Tag 2: 1,74 mm und am Tag 5: 2,18 mm	22
Abb. 9: Anfärbung von Ki-67	
a) in der Wurzelscheide eines in Williams E Medium kultivierten Follikels	
b) in der Papille und der Wurzelscheide eines in Me 30 µmol kultivierten Follikels	
c) in der Papille eines in Me+P 30 µmol kultivierten Follikels	34

**Diagramme:**

Diagr. 1:	Relatives Haarfollikelwachstum in Williams E Medium	23
Diagr. 2:	Täglicher Längenzuwachs der Haarfollikel in Williams E Medium	24
Diagr. 3:	Anteil wachsender Haarfollikel in Williams E Medium in Abhängigkeit vom Untersuchungstag	25
Diagr. 4:	Relatives Wachstum der Haarfollikel in Melatonin im $\mu\text{mol}$ -Bereich	29
Diagr. 5:	Relatives Wachstum der Haarfollikel in Melatonin im $\text{mmol}$ -Bereich	31
Diagr. 6:	Wachstumsverhalten in Me 30 $\mu\text{mol}$ , Williams E Medium und Me+P 30 $\mu\text{mol}$	32

**Tabellen:**

Tab. 1:	Meßdatenauswertung des Follikelwachstums unter Williams E Medium	25
Tab. 2:	Statistik für das Wachstum in Melatonin im $\mu\text{mol}$ -Bereich	28
Tab. 3:	Statistik für das Wachstum in Melatonin im $\text{mmol}$ -Bereich	30
Tab. 4:	Statistische Signifikanzen aus dem Vergleich der Testmedien im Mann-Whitney-Test	33



Probe	Me 2 mmol								
	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
1	0,2	0,54	0,68	0,82	0,92	1,04	1,04	1,04	1,04
2	0,36	0,6	0,72	0,94	1,08	1,3	1,32	1,32	1,4
3	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
4	0	0,1	0,14	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
5	0,18	0,4	0,52	0,74	0,96	1	1,04	1,1	1,1
6	0,08	0,18	0,26	0,38	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
7	0	0,1	0,1	0,12	0,14	0,18	0,18	0,18	0,18
8	0,18	0,36	0,56	0,76	0,96	1,02	1,02	1,02	1,02
9	0,06	0,18	0,2	0,22	0,24	0,3	0,34	0,42	0,42
10	0,04	0,04	0,12	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
11	0,08	0,08	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
12	0	0	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
13	0,64	0,92	0,94	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
14	0,18	0,38	0,7	0,78	1,1	1,3	1,4	1,48	1,56
15	0,16	0,26	0,38	0,44	0,66	0,74	0,86	0,9	0,9
16	0,08	0,1	0,12	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
17	0	0,32	0,42	0,46	0,66	0,76	0,76	0,76	0,76
18	0,14	0,44	0,74	0,84	1,04	1,14	1,26	1,26	1,26
19	0,16	0,3	0,84	0,96	1,16	1,4	1,4	1,4	1,4
20	0,16	0,32	0,46	0,62	0,66	0,76	0,76	0,76	0,76
21	0,12	0,22	0,34	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
22	0,06	0,1	0,14	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
23	0,18	0,34	0,48	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
24	0,28	0,62	0,84	1,06	1,3	1,56	1,72	1,88	2,02
25	0	0,1	0,14	0,18	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
26	0,08	0,14	0,16	0,2	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
27	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
28	0,05	0,1	0,36	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
29	0,06	0,24	0,4	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
30	0,36	0,36	0,38	0,4	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
31	0,18	0,54	0,74	0,94	1,14	1,34	1,34	1,34	1,34
32	0	0,16	0,2	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
33	0,06	0,2	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
34	0,8	0,92	1,1	1,2	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38



[illegible]



				Me 20 $\mu\text{mol}$					
Probe	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
1	0	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
2	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
3	0,04	0,2	0,32	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
4	0,34	0,36	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
5	0	0,16	0,28	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
6	0,32	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
7	0,56	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
8	0,62	0,78	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
9	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
10	0,38	0,38	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
11	0,24	0,3	0,32	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
12	0	0	0,32	0,84	0,96	1,06	1,16	1,52	1,92
13	0,16	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
14	0,28	0,52	0,72	0,9	1,02	1,2	1,42	1,42	1,42
15	0,58	0,58	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
16	0,3	0,58	0,74	1,04	1,12	1,18	1,32	1,32	1,32
17	0,24	0,46	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
18	0,16	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
19	0,36	0,58	0,72	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
20	0,06	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
21	0,36	0,48	0,58	0,74	0,82	0,9	1	1,1	1,22
22	0,68	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
23	0,18	0,28	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
24	0	0,14	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
25	0,3	0,52	0,72	0,94	1,04	1,22	1,32	1,52	1,52

	Me 30 µmol								
Probe	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
1	0,26	0,26	0,4	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
2	0,08	0,14	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3	0,8	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
5	0,16	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
6	0,06	0,12	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
7	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
8	0,36	0,56	0,8	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
9	0,18	0,18	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
10	0,74	0,76	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
11	1	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
12	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
13	0,76	0,8	0,82	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
14	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
15	0,7	1,2	1,48	1,7	1,9	2,2	2,4	2,72	2,78
16	0,56	0,76	0,92	1,12	1,18	1,24	1,32	1,32	1,32
17	0,16	0,36	0,48	0,66	0,74	0,9	1,2	1,36	1,78
18	0,14	0,28	0,34	0,54	0,58	0,6	0,64	0,88	1,14
19	0,14	0,26	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
20	0,3	0,64	0,8	0,84	0,86	0,9	0,96	1,06	1,18
21	0,04	0,14	0,14	0,5	0,62	0,74	0,92	1,06	1,06
22	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
23	0,24	0,44	0,6	0,76	0,84	0,98	1,06	1,2	1,26
24	0,4	0,6	0,66	0,8	0,84	0,88	0,9	0,9	0,9
25	0,28	0,5	0,72	0,92	1,08	1,24	1,4	1,46	1,56
26	0,26	0,42	0,6	0,82	0,94	1,04	1,18	1,48	1,82
27	0,26	0,42	0,54	0,7	0,82	1,08	1,34	1,5	1,6
28	0,74	1,08	1,32	1,58	1,68	1,78	1,88	2,34	2,34

Probe	Me 40 µmol								
	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
1	0,04	0,08	0,14	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
2	0	0,1	0,22	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
3	0	0,18	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
4	0,24	0,42	0,56	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
5	0,14	0,52	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
6	0,06	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
7	0,2	0,6	1	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
8	0	0,14	0,32	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
9	0,08	0,32	0,56	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
10	0,26	0,38	0,46	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
11	0	0,24	0,5	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
12	0,2	0,52	0,74	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
13	0,18	0,26	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
14	0,16	0,54	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
15	0,06	0,22	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
16	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
17	0,3	0,5	0,72	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
18	0,22	0,28	0,48	0,54	0,68	0,82	0,98	0,98	0,98
19	0	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
20	0	0,24	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
21	0,1	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
22	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
23	0,14	0,32	0,52	0,88	0,9	0,92	0,94	0,94	0,94
24	0,26	0,58	0,82	0,94	1,12	1,26	1,44	1,44	1,44
25	0,38	0,7	1,04	1,24	1,36	1,48	1,6	1,6	1,6
26	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
27	0,5	0,78	1,2	1,24	1,38	1,5	1,7	1,7	1,7
28	0,18	0,4	0,64	0,9	1,04	1,16	1,3	1,3	1,3
29	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
30	0,4	0,7	0,84	0,9	0,96	1,02	1,08	1,08	1,08
31	0,12	0,3	0,56	0,66	0,72	0,8	0,88	0,88	0,88
32	0,28	0,52	0,76	0,98	1,18	1,36	1,56	1,56	1,56

Probe	Me + P 30 μmol								
	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
1	0,5	0,5	0,54	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
2	0,08	0,2	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
3	0,04	0,12	0,2	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
4	0,06	0,18	0,3	0,4	0,42	0,44	0,44	0,44	0,44
5	0,12	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
6	0,04	0,16	0,18	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
7	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
8	0,18	0,38	0,68	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
9	0,08	0,28	0,42	0,68	0,7	0,74	0,78	0,78	0,78
10	0,06	0,06	0,1	0,14	0,16	0,18	0,22	0,22	0,22
11	0,6	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
12	0,52	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
13	0	0,14	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
14	0,3	0,3	0,32	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
15	0	0,1	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
16	0,08	0,08	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
17	0,38	0,48	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
18	0,12	0,16	0,22	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
19	0,22	0,5	0,82	1,22	1,48	1,74	2,14	2,14	2,14
20	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
21	0	0,08	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
22	0,48	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
23	0,12	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
24	0	0,08	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
25	0,1	0,1	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
26	0,36	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
27	0,06	0,12	0,3	0,42	0,44	0,48	0,52	0,52	0,52
28	0	0,06	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
29	0,36	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
30	0,1	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
31	0,16	0,1	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
32	0,04	0,16	0,16	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
33	0,3	0,32	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
34	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
35	0,04	0,2	0,24	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
36	0,12	0,28	0,72	1,06	1,34	1,78	2,1	2,1	2,1
37	0	0,04	0,06	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14

Probe	Williams E Medium								
	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
1	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
2	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
3	0,3	0,68	0,94	1,3	1,64	1,8	2,14	2,38	2,74
4	0,5	0,66	0,76	0,9	1,1	1,22	1,38	1,42	1,6
5	0,02	0,2	0,42	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
6	0,2	0,36	0,58	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
7	0,06	0,22	0,4	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
8	0	0,02	0,2	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
9	0,1	0,46	0,86	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
10	0,1	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
11	0,12	0,2	0,22	0,26	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
12	0,28	0,58	0,84	1,04	1,24	1,48	1,64	1,8	1,88
13	0,3	0,6	0,82	1,16	1,38	1,54	1,7	1,8	1,88
14	0,26	0,64	0,74	0,9	1,06	1,24	1,34	1,46	1,46
15	0,04	0,16	0,16	0,16	0,16	0,12	0,12	0,12	0,12
16	0,06	0,1	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
17	0,66	0,68	0,7	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
18	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
19	0,72	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
20	0,52	0,56	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
21	0,14	0,14	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
22	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16
23	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
24	0,1	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
25	0,1	0,64	0,82	1	1	1	1	1	1
26	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
27	0,14	0,14	0,28	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
28	0,08	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
29	0,12	0,12	0,16	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
30	0,74	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
31	0,14	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
32	0,04	0,1	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
33	0,34	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
34	0,14	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
35	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58
36	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
37	0,22	0,44	0,62	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
38	0,08	0,26	0,52	0,74	1,08	1,26	1,42	1,42	1,42
39	0,14	0,34	0,52	0,78	1,02	1,22	1,3	1,3	1,3
40	0,28	0,62	0,78	0,96	1,1	1,22	2	2	2
41	0,08	0,38	0,64	0,94	1,26	1,66	1,84	1,84	1,84

				Williams E Medium					
Probe	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
42	0,22	0,5	0,7	0,9	1,18	1,38	1,56	1,56	1,56
43	0,22	0,24	0,26	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
44	0,12	0,36	0,46	0,56	0,66	0,82	0,96	1,04	1,16
45	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
46	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
47	0,16	0,52	0,7	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
48	0,1	0,32	0,34	0,48	0,6	0,74	0,86	0,86	0,86
49	0,2	0,46	0,62	0,7	0,8	0,9	1	1	1
50	0,38	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
51	0,06	0,12	0,16	0,18	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
52	0,14	0,46	0,7	0,9	1,1	1,3	1,56	1,86	2,02
53	0,22	0,06	0,64	0,74	0,84	0,9	0,79	0,79	0,79
54	0,56	0,64	0,8	0,82	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
55	0,02	0,26	0,58	0,68	0,84	1,02	1,18	1,38	1,66
56	0,02	0,34	0,44	0,24	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
57	0,2	0,52	0,86	0,96	1,16	1,28	1,52	1,54	1,62
58	0,14	0,28	0,44	0,44	0,44	1,08	1,12	1,12	1,12
59	0,1	0,34	0,6	0,9	1,1	1,2	1,36	1,5	1,62
60	0,12	0,08	0,18	0,28	0,4	0,42	0,52	0,52	0,52
61	0,08	0,88	1,36	1,44	1,54	1,7	1,84	1,94	2,1
62	0,06	0,1	0,32	0,46	0,6	0,76	0,86	0,86	0,86
63	0,1	0,38	0,72	0,88	1,16	1,48	1,74	1,88	1,98
64	0	0,5	0,92	1,12	1,38	0,58	1,82	1,9	1,92
65	0	0,04	0,2	0,36	0,44	0,6	0,6	0,6	0,6
66	0,64	0,84	0,84	0,84	0,84	1,02	1,02	1,08	1,08
67	0,16	0,44	0,7	0,9	1	1,1	1,1	1,1	1,1
68	0,18	0,26	0,64	0,72	0,96	1,24	1,32	1,38	1,48
69	0,26	0,54	0,88	0,94	0,2	1,28	1,28	1,28	1,28
70	0,52	0,64	0,9	1,04	1,36	1,56	1,8	1,88	2,04
71	0,16	0,26	0,44	0,56	0,64	0,8	0,96	1,12	1,3
72	0,06	0,18	0,32	0,4	0,58	0,78	0,9	0,98	1,06
73	0,1	0,26	0,4	0,52	0,66	0,8	1	1,1	1,24
74	0,3	0,6	0,9	1,02	1,34	1,54	1,74	1,9	2,08
75	0,04	0,12	0,22	0,22	0,24	0,32	0,52	0,58	0,58
76	0,14	0,22	0,62	0,78	1,06	1,28	1,5	1,58	1,78
77	0,12	0,28	0,44	0,6	0,8	0,96	1,1	1,2	1,36
78	0,1	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
79	0,26	0,48	0,7	1,02	1,16	1,44	1,64	1,64	1,64
80	0,16	0,3	0,44	0,52	0,62	0,66	0,7	0,7	0,92
81	0,22	0,3	0,56	0,76	0,98	1,16	1,36	1,46	1,68
82	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Probe	Williams E Medium								
	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag
83	0	0,02	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
84	0	0	0,12	0,12	0,12	0,24	0,42	0,44	0,56
85	0,06	0,1	0,16	0,18	0,2	0,2	0,26	0,26	0,26
86	0,3	0,3	0,56	0,66	0,76	0,9	0,9	0,96	0,96
87	0,4	0,8	1	0,3	0,54	1,66	1,66	1,66	1,66
88	0,28	0,46	0,94	1,08	1,36	1,8	1,8	1,8	1,8
89	0,1	0,24	0,36	0,46	0,56	0,66	0,76	0,92	0,92
90	0,34	0,64	0,92	1,16	1,32	1,68	1,68	1,68	1,68
91	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
92	0,04	0,14	0,26	0,46	0,5	0,54	0,54	0,54	0,54
93	0,3	0,62	0,89	1,2	1,34	1,7	1,8	1,98	2,04
94	0,36	0,62	1,06	1,38	1,7	2	2,2	2,36	2,48
95	0,18	0,5	0,8	1,1	1,36	1,58	1,74	1,9	2,1
96	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
97	0,12	0,18	0,22	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
98	0,74	0,82	0,86	0,88	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
99	0,12	0,12	0,16	0,2	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
100	0,42	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
101	0,62	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
102	0,8	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
103	1,48	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52
104	0,36	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
105	0,44	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
106	0,1	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
107	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
108	0,56	0,92	1,16	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
109	0,28	0,4	0,62	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
110	0,38	0,56	0,62	0,72	0,82	0,92	1,02	1,02	1,02
111	0,08	0,16	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
112	0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
113	0,52	0,64	0,86	1,02	1,14	1,26	1,38	1,38	1,38
114	1,26	1,5	1,76	1,98	2,06	2,2	2,34	2,4	2,4
115	0,24	0,42	0,62	0,72	0,8	0,9	1,02	1,02	1,02
116	0,18	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
117	0,38	0,38	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
118	0,24	0,38	0,62	0,72	0,78	0,82	0,94	0,94	0,94
119	0,22	0,46	0,6	0,9	1,02	1,18	1,3	1,3	1,3
120	0	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
121	0,46	0,66	1,2	1,4	1,5	1,6	1,7	1,9	2,1
122	0,26	0,54	0,8	0,98	1,14	1,38	1,52	1,62	1,62
123	0,22	0,46	0,62	0,76	0,8	0,84	0,88	1,02	1,06





## **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Professor Dr. med. P. Elsner für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die freundliche Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. med. T. Fischer für seine fachliche und stets motivierende Betreuung sowie hilfreichen Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Forschungslabors unter Leitung von Frau Dr. rer. nat. U.-C. Hipler, die mir stets mit fachlicher und praktischer Hilfe zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Hautklinik in Gera sowie des Nothilfezentrums in Jena für die Bereitstellung von Kopfhautpräparaten bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei Herrn M. Franke für seine Unterstützung bei der Erstellung der computergestützten Bild- und Datenauswertung sowie bei meinen Eltern für die Korrektur der ersten Manuskripte und den herzlichen Beistand während meiner gesamten Studienzeit einschließlich der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bad Langensalza, 4.4.2002

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und daß ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Prof. Dr. med. P. Elsner, Dr. med. T. Fischer.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen, und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation habe ich noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ebenso habe ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bad Langensalza, 4.4.2002

## **Lebenslauf**

Name: Fischer, Anja  
Wohnort: Illebener Weg 21, 99947 Bad Langensalza  
Geburtsdatum und -ort: 10.03.1977; Sömmerda  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung**

1983 - 1991 Polytechnische Oberschule „Karl-Marx“, Sömmerda  
1991 - 1995 „Albert-Schweitzer“ – Gymnasium, Sömmerda

### **Studium**

10.1995 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
09.1997 Ärztliche Vorprüfung/ FSU Jena  
09.1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/ FSU Jena  
09.2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/ FSU Jena  
10.2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/ FSU Jena  
12.2001 Beendigung des Humanmedizinstudiums

### **Berufliche Tätigkeit**

01.2002 Beginn ÄIP am Hufelandkrankenhaus Bad Langensalza